

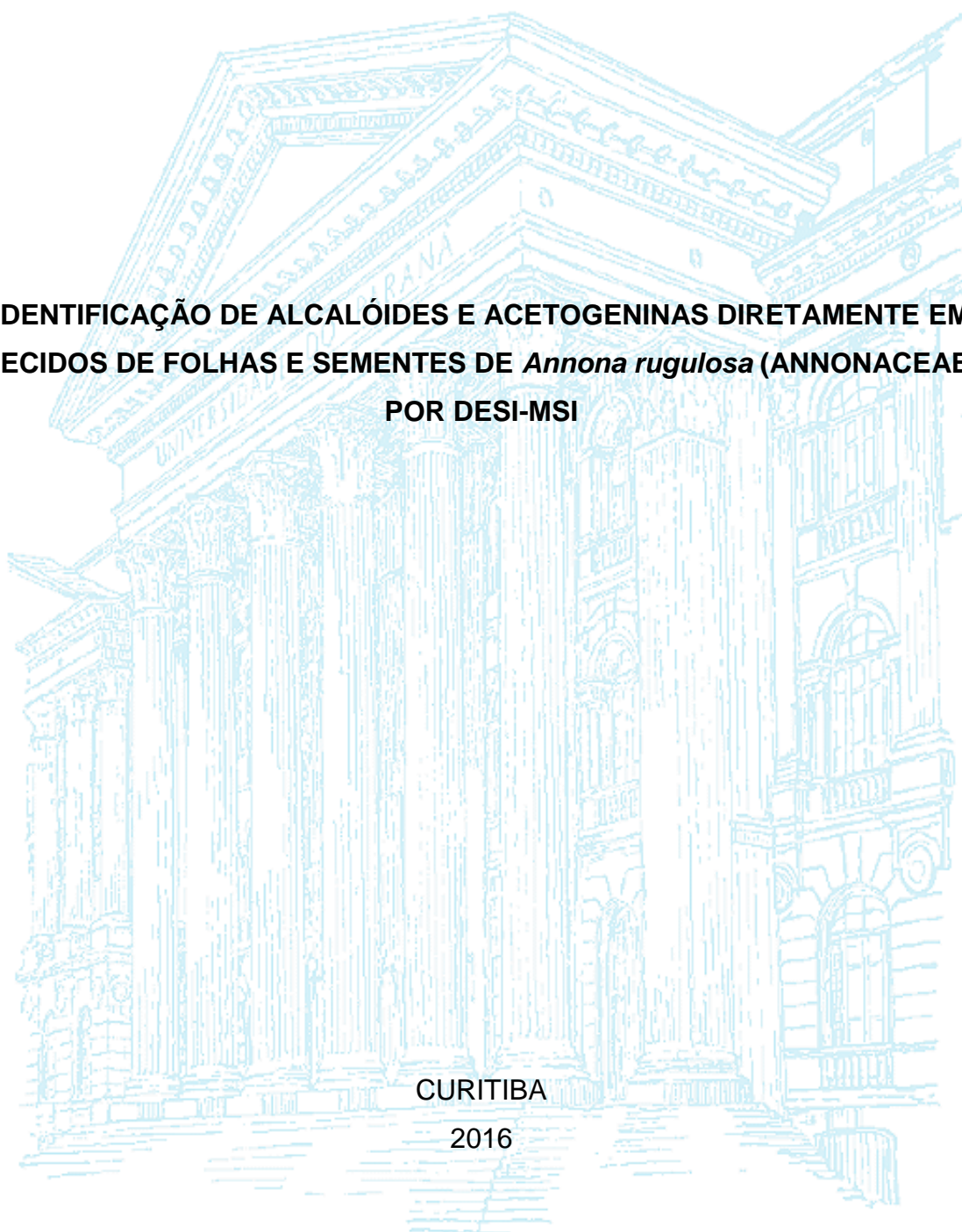
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTEVAN R. D. BRUGINSKI

**IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES E ACETOGENINAS DIRETAMENTE EM
TECIDOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Annona rugulosa* (ANNONACEAE)
POR DESI-MSI**

CURITIBA

2016



ESTEVAN R. D. BRUGINSKI

**IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES E ACETOGENINAS DIRETAMENTE EM
TECIDOS DE FOLHAS E SEMENTES DE *Annona rugulosa* (Annonaceae) POR
DESI-MSI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr^a Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2016

Bruginski, Estevan R. D.

Identificação de alcaloides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* (Annonaceae) por DESI-MSI / Estevan R. D. Bruginski - Curitiba, 2016.
88 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Francinete Ramos Campos

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Alcaloides. 2. Acetogeninas. 3. *DESI imaging*. 4. *Annona rugulosa*. 5. *Mass spectrometry imaging*. I. Campos, Francinete Ramos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321


TERMO DE APROVAÇÃO

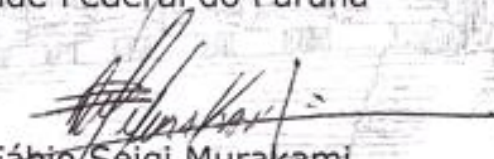
ESTEVAN RAFAEL DUTRA BRUGINSKI

Título: "IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES E ACETOGENINAS DIRETAMENTE EM FOLHAS E SEMENTES DE *Annona rugulosa* (Annonaceae) POR DESI-IM-HRMS"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof^a. Dr^a. Francinete Ramos Campos
Orientadora


Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, colaborando com tempo e conhecimento sem nada esperar em troca. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão.

Primeiramente agradeço aos meus pais, em especial a minha mãe, pela oportunidade e apoio que sempre me deram desde o início da minha carreira.

A minha orientadora pelos ensinamentos valiosos sobre a ciência e pela paciência e tempo dedicado aos seus alunos orientados em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin e seus colaboradores, em especial a Dra. Elaine C. Cabral e Dr. Nicolas V. Schwab do Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon da Universidade Estadual de Campinas, por todos os conhecimentos compartilhados e pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar quando era necessário, tornando o trabalho muito melhor e mais divertido.

Ao CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

A ionização de dessorção por eletrospray (DESI) acoplada a espectrometria de massas (MS) é uma técnica capaz de analisar amostras sólidas e em condições ambientes com sensibilidade e especificidade. Devido a facilidade de manuseio e a obtenção de resultados em tempo real, a DESI-MS vem sendo utilizada em diversos tipos de aplicações, como por exemplo, análises forenses, produtos naturais, biomédicas, entre outras. A capacidade de realizar *mass spectrometry imaging* (MSI) é muito explorada na análise de biomoléculas diretamente em tecidos animais e vegetais. Esta técnica foi utilizada para obtenção de MSI de alcaloides e acetogeninas por DESI direta em tecidos de folhas e da DESI indireta (*imprint*) da semente de *Annona rugulosa*. Estes metabólitos foram previamente identificados nos extratos em metanol, através da infusão direta por ESI(+)-HRMS, utilizando-se o erro do defeito de massas e a fragmentação em cela de colisão do tipo HCD. Para a obtenção dos dados por DESI-MSI, foram utilizados os seguintes parâmetros: voltagem do capilar +5 kV; metanol como solvente do spray; fluxo de 3 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Foram identificados nos extratos das folhas e sementes, onze alcaloides e oito acetogeninas. Dentre os alcaloides identificados, sete são aporfínicos (anonaina, nornantenina, *N*-nornuciferina, xilopina, litseferina, assimilobina e norisocoridina/isoboldina), dois oxoaporfínicos (lanuginosina e liriodenina) e dois benziltetrahydroisoquinolínicos (magnococlina/*N*-metilcocclaurina e reticulina), e dentre as acetogeninas, sete com grupo hidroxila no C-4, confirmados através da perda neutra do anel γ -lactona (112 Da). Estes mesmos metabólitos foram identificados por DESI-MSI. Esta técnica se mostrou eficaz para a análise rápida de alcaloides e acetogeninas em tecidos vegetais de *A. rugulosa*, com mínimo ou nenhum preparo de amostra.

Palavras chave: Alcaloides; Acetogeninas; DESI *imaging*; *Annona rugulosa*; *mass spectrometry imaging*

ABSTRACT

The desorption electrospray ionization (DESI) coupled with mass spectrometry (MS) is a technique able to analyze solid samples at ambient conditions, with sensitivity and specificity. Due to ease of handling and the obtaining of real time results, the DESI-MS has been used in various applications, like forensics, natural products, biomedical analyzes, and others. The ability to obtain molecular imaging is much exploited in biomolecules analyzes in animal and vegetal tissues. This technique was used to obtain the mass spectrometry images (MSI) of eleven alkaloids and eight acetogenins by DESI direct in the leaf tissue and by DESI indirect (imprint) of the seed of *Annona rugulosa*. These metabolites was previously identified by direct infusion ESI(+)-HRMS, the metabolites were identified through their mass defect error and mass spectrometry *tandem* in a HCD collision cell. To obtain the molecular images by DESI-MSI, the following parameters were optimized: capillary voltage +5 kV; methanol as solvent spray, flow of 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Among the alkaloids identified, seven are aporphine (anonaine, nornantenine, *N*-nornuciferine, xylophine, litseferine, asimilobine and norisocorydine/isoboldine), two oxoaporphine (lanuginosine and liriodenine) and two benzyltetrahydroisoquinoline (magnococline/*N*-methylcocclaurine and reticuline), and among the acetogenins, seven have a hydroxyl group at the C-4, which are confirmed through the neutral loss of the γ -lactone ring (112 Da). These same metabolites were also identified by DESI-MSI. These technique proved be effective to determine alkaloids and acetogenins in vegetal tissues of *A. rugulosa*, with minimum or non-sample preparation.

Keywords: Alkaloids; Acetogenins; DESI *imaging*; *Annona rugulosa*; *mass spectrometry imaging*

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA ANNONACEAE JUSS NO MUNDO. | 17 |
| FIGURA 2 - EXEMPLAR DE <i>Annona rugulosa</i> LOCALIZADO EM CURITIBA/PR.... | 20 |
| FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS MARCADORES QUIMIOTAXONOMICOS DO GENERO ANNONACEAE..... | 24 |
| FIGURA 4 – TIPOS DE ESQUELETOS ESTRUTURAIS DAS ACETOGENINAS. | 25 |
| FIGURA 5 - PROVÁVEL VIA DA BIOSÍNTESE DOS ANÉIS THF DAS ACETOGENINAS. | 26 |
| FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI)..... | 29 |
| FIGURA 7 – MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA DESI. | 30 |
| FIGURA 8 - PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MSI DE ÍONS UTILIZANDO A DESI. | 31 |
| FIGURA 9 - PREPARO E ANÁLISE DO MATERIAL BOTÂNICO..... | 36 |
| FIGURA 10 - PREPARO DA AMOSTRA COM E SEM PRÉ-TRATAMENTO..... | 37 |
| FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE IMPRINTING DA SEMENTE. | 38 |
| FIGURA 12 – CCDA DO PADRÃO ANONACINA E DE AMOSTRAS DE A. RUGULOSA (1); EXTRATO MEOH (2); EXTRATO ETOH (3); FRAÇÃO CH ₂ CL ₂ (4); PRECIPITADO DA FRAÇÃO CH ₂ CL ₂ (5); FRAÇÃO ALCALOÍDICA (6); SUBFRAÇÃO 1 (7); SUBFRAÇÃO 2 (8). | 41 |
| FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO (α) NA FONTE DESI..... | 43 |
| FIGURA 14 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA ANONINA (A) E ASIMIOLOBINA (B)..... | 51 |
| FIGURA 15 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA N- NORNUCIFERINA | 52 |
| FIGURA 16 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA XILOPINA..... | 53 |
| FIGURA 17 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA LITSEFERINA. | 53 |
| FIGURA 18 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA NORNANTENINA..... | 54 |
| FIGURA 19 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA RETICULINA. | 55 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 20 - REARRANJO MOLECULAR REFERENTE A PERDA NEUTRA DE 112 DA. | 56 |
| FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALCALOIDES ANONAINA (A), RETICULINA (B) E LIRIODENINA (C) POR DESI DIRETA NA FOLHA DE A. RUGULOSA (D) POR DESI(+)-MSI. | 60 |
| FIGURA 22 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALCALOIDES ASIMILOBINA (A) E NORISOCORIDINA (B) POR DESI DIRETA NA FOLHA DE A. rugulosa (C) POR DESI(+)-MSI. | 61 |
| FIGURA 23 - DISTRIBUIÇÃO DAS ACETOGENINAS ENCONTRADAS POR DESI DIRETA NA FOLHA DE A. rugulosa (G) POR DESI(+)-MSI. | 62 |
| FIGURA 24 - IMAGENS DOS ALCALOIDES OBTIDAS POR DESI-MSI DO IMPRINT DA SEMENTE DE A. rugulosa (A) POR DESI(+)-MSI. | 64 |
| FIGURA 25 – DISTRIBUIÇÃO DAS ACETOGENINAS OBTIDAS POR DESI-MSI DO IMPRINT DA SEMENTE DE A. rugulosa (A) POR DESI(+)-MSI. | 65 |
| FIGURA 26 - DISTRIBUIÇÃO DAS ACETOGENINAS OBTIDAS POR DESI-MSI DO IMPRINT DA SEMENTE DE A. rugulosa (A) POR DESI(+)-MSI. | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - ESPÉCIES UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR E SUA INDICAÇÃO. | 18 |
| TABELA 2 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALCALOIDES EXTRAÍDOS DE FONTES E SUAS RESPECTIVAS CLASSES | 22 |
| TABELA 3 - PARAMETROS UTILIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DOS SINAIS DOS ALCALOIDES NO ESPECTROMETRO DE MASSAS Q EXACTIVE™. 39 | |
| TABELA 4 – PARÂMETROS OTIMIZADOS NAS FONTES ESI E DESI PARA A ANÁLISE DE ALCALOIDES E ACETOGENINAS. | 42 |
| TABELA 5 - ALCALOIDES IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS EM MEOH DAS FOLHAS E SEMENTES DE <i>Annona rugulosa</i> | 46 |
| TABELA 6 - ACETOGENINAS ENCONTRADAS NO EXTRATO EM MEOH DAS FOLHAS DE <i>A. rugulosa</i> | 49 |
| TABELA 7 – POSSÍVEIS ACETOGENINAS ENCONTRADAS NOS EXTRATOS EM MEOH DAS FOLHAS E SEMENTES DE <i>A. rugulosa</i> | 50 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO 1 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ANONAINA POR ESI(+)-MS... | 78 |
| ANEXO 2 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ASIMIOLOBINA POR ESI(+)-MS | 78 |
| ANEXO 3 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA N-NORNUCIFERINA POR ESI(+)-MS | 79 |
| ANEXO 4 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA XILOPINA POR ESI(+)-MS | 79 |
| ANEXO 5 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA MAGNOCOCLINA/N- METILCOCLAURINA POR ESI(+)-MS | 80 |
| ANEXO 6 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO LITSEFERINA POR ESI(+)-MS. ... | 80 |
| ANEXO 7 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA NORNANTENINA POR ESI(+)- MS | 81 |
| ANEXO 8 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA NORISOCORIDINA POR ESI(+)-MS. | 81 |
| ANEXO 9 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA RETICULINA POR ESI(+)-MS. | 82 |
| ANEXO 10 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG1 POR ESI(+)-MS | 82 |
| ANEXO 11 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG2 POR ESI(+)-MS | 83 |
| ANEXO 12 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG3 POR ESI(+)-MS | 83 |
| ANEXO 13 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG4 POR ESI(+)-MS | 84 |
| ANEXO 14 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG5 POR ESI(+)-MS | 84 |
| ANEXO 15 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG6 POR ESI(+)-MS | 85 |
| ANEXO 16 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG7 POR ESI(+)-MS | 85 |
| ANEXO 17 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG8 POR ESI(+)-MS | 86 |
| ANEXO 18 - IMAGENS DOS ALCALOIDES LANUGINOSINA (A), LITSEFERINA (B) E MAGNOCOCLINA (C) DIRETAMENTE NA FOLHA DE A. rugulosa (D) POR DESI(+)-MSI. | 87 |
| ANEXO 19 - IMAGENS DOS ALCALOIDES N-NORCIFERINA (A), NORNANTENINA (B) E XILOPINA (C) DIRETAMENTE NA FOLHA DE A. rugulosa (D) POR DESI(+)-MSI. | 88 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------------------|---|
| α | - Alfa |
| γ | - Gama |
| RMN de ^1H | - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| RMN de ^{13}C | - Ressonância magnética nuclear de carbono 13 |
| DESI | - Ionização de dessorção por eletrospray |
| ETOH | - Etanol |
| ESI | - Ionização por eletrospray |
| GC-MS | - Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas |
| HCD | - <i>High collision dissociation</i> |
| HPLC | - Cromatografia a líquido de alta eficiência |
| HRMS | - Espectrometria de massas de alta resolução |
| LRMS | - Espectrometria de baixa resolução |
| MALDI | - Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz |
| MEOH | - Metanol |
| MS | - Espectrometria de massas |
| MSI | - <i>Imaging mass spectrometry</i> |
| PTFE | - Teflon |
| SNC | - Sistema nervoso central |
| THF | - Tetrahidrofurano |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 | FAMÍLIA ANNONACEAE | 17 |
| 3.1.1 | Gênero <i>Annona</i> Linn. | 18 |
| 3.1.2 | <i>Annona rugulosa</i> | 19 |
| 3.2 | METABÓLITOS SECUNDÁRIOS..... | 20 |
| 3.2.1 | Alcalóides: biossíntese e atividade biológica | 21 |
| 3.2.2 | Acetogeninas: biossíntese e atividade biológica | 24 |
| 3.3 | ESPECTROMETRIA DE MASSAS | 28 |
| 3.3.1 | Ionização de dessorção por eletrospray (DESI)..... | 28 |
| 3.3.2 | Identificação de moléculas por espectrometria de massas | 32 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 4.1 | CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA | 34 |
| 4.2 | EQUIPAMENTOS | 34 |
| 4.3 | COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA..... | 35 |
| 4.4 | PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO..... | 35 |
| 4.4.1 | Preparo das folhas para análise por ESI-HRMS e DESI direta..... | 36 |
| 4.4.2 | Preparo das sementes para análise por ESI-HRMS e DESI indireta | 37 |
| 4.5 | OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS | 38 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 | CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCDA) | 40 |
| 5.2 | PARÂMETROS ÓTIMIZADOS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS | 42 |
| 5.3 | ANÁLISE DE EXTRATOS E TECIDOS DE <i>Annona rugulosa</i> | 44 |
| 5.3.1 | Análise por ESI-HRMS de extratos de folhas e sementes | 44 |
| 5.3.1.1 | Identificação dos alcaloides por Espectrometria de Massas Sequencial | 51 |
| 5.3.1.2 | Identificação de acetogeninas por Espectrometria de Massas Sequencial | 55 |
| 5.3.2 | Análise por DESI direta da folha | 58 |
| 5.3.2.1 | Pré-tratamento das folhas | 58 |
| 5.3.2.2 | Mapeamento dos íons por DESI-MSI das folhas | 59 |
| 5.3.3 | Análise por DESI indireta (<i>imprint</i>) da semente | 63 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 69 |

| | | |
|----------|--------------------------|-----------|
| 7 | REFERÊNCIAS | 70 |
| | ANEXOS | 78 |

1 INTRODUÇÃO

O estudo de produtos naturais é uma etapa importante na descoberta de novas moléculas com atividade biológica, estas informações também são utilizadas na preservação e na classificação quimiotaxonômica de muitas espécies sendo utilizadas também como ponto de partida para diversos produtos de semi-síntese (ATANASOV et al., 2015; COSTA, 2009; LUDWICZUK; ASAKAWA, 2014, 2015).

Embora existam diversas pesquisas com produtos naturais, uma grande parte é direcionada ao isolamento e identificação de metabólitos secundários de plantas. Entretanto, estes são laboriosos, dispensando muito tempo e recursos para a realização das análises, e em muitos casos são obtidas informações que já são conhecidas. Neste sentido, o emprego de novas tecnologias é necessário, com o objetivo de economizar tempo e recursos na análise exploratória de metabólitos secundários.

Na fitoquímica, muitos métodos de separação e técnicas de análise são utilizadas como estratégia na identificação de metabólitos secundários, entre eles há um destaque maior para as técnicas de cromatografia a líquido e a gás, ambas acopladas a espectrometria de massas (HPLC-MS e GC-MS) e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) (GU et al., 1997; MARSHALL et al., 2014). Nestes métodos de análise existem muitos processos que podem alterar a composição química através da degradação e a formação de artefatos. Por isso, existe a necessidade de técnicas que tenham a capacidade de detectar estes metabólitos secundários de forma rápida e com o mínimo/ou nenhum preparo de amostra, evitando assim que informações importantes acabem se perdendo (SEIDEL, 2012).

A análise de metabólitos diretamente em tecidos biológicos é uma aplicação recente na área de espectrometria de massas. Através de fontes de ionização direta é possível analisar metabólitos secundários *in situ*, podendo ser empregada na análise de metabólitos suscetíveis a degradação e que podem formar artefatos no preparo da amostra. Além disso, ela pode ser também utilizada em aplicações *high throughput* (HSU; DORRESTEIN, 2015; TALATY; TAKÁTS; COOKS, 2005).

A fonte de ionização de dessorção por eletrospray (DESI) é uma fonte de ionização direta, que foi desenvolvida com o objetivo de realizar análises

diretamente nas amostras e em condições ambientes. A fonte DESI utiliza-se de um electrospray para a formação de um jato de micro gotículas que são direccionadas para a amostra, ionizando e desolvendo os íons que estão à superfície. O impacto do electrospray faz com que sejam formados íons na fase gasosa, que são atraídos com o auxílio de voltagens e do sistema de vácuo, e direccionados para o analisador de massas. A identificação dos analitos é confirmada através de espectrometria de massas sequencial (MS^n) e do defeito de massas em espectrômetros de alta resolução (TAKÁTS et al., 2004).

Através da DESI é possível realizar a análise de tecido de diversas partes da planta, podendo ser observado também a distribuição destes metabólitos pelo tecido vegetal através da *imaging mass spectrometry* (MSI). Além disso, a amostra é preservada podendo ser utilizada para outros testes (CABRAL et al., 2013; GARRETT et al., 2014).

A *Annona rugulosa*, é uma espécie de árvore nativa do Brasil pertencente ao género *Annona*, conhecida pela produção de frutos comestíveis, sendo também utilizada na medicina tradicional para o tratamento de dor de garganta e dores renais. Em muitas espécies deste género já foram identificados diversos metabólitos secundários, como os alcaloides e as acetogeninas. Entretanto, diferentemente dos alcaloides o isolamento e a identificação das acetogeninas é um desafio para técnicas que são utilizadas frequentemente, como a RMN de 1H e ^{13}C , devido a grande variedade de tipos de cadeia e a presença de muitos isômeros (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990).

Por isso, a utilização de técnicas que possam direccionar a detecção de metabólitos diretamente nos tecidos com o mínimo ou nenhum preparo de amostra como a DESI-MSI são extremamente atrativas. Devido ao baixo custo e por não ser uma análise destrutiva, podendo utilizar a amostra para outros fins. Além disso, é possível obter a distribuição destes metabólitos *in situ* nas folhas e sementes através da espectrometria de massas de imagem, sendo estas informações uteis para futuras investigações na busca de moléculas alvo.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo a detectar e identificar alcaloides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* por DESI-MSI.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e mapear os alcaloides e acetogeninas em folhas e sementes de *Annona rugulosa* através da DESI-MSI, com mínimo preparo de amostra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

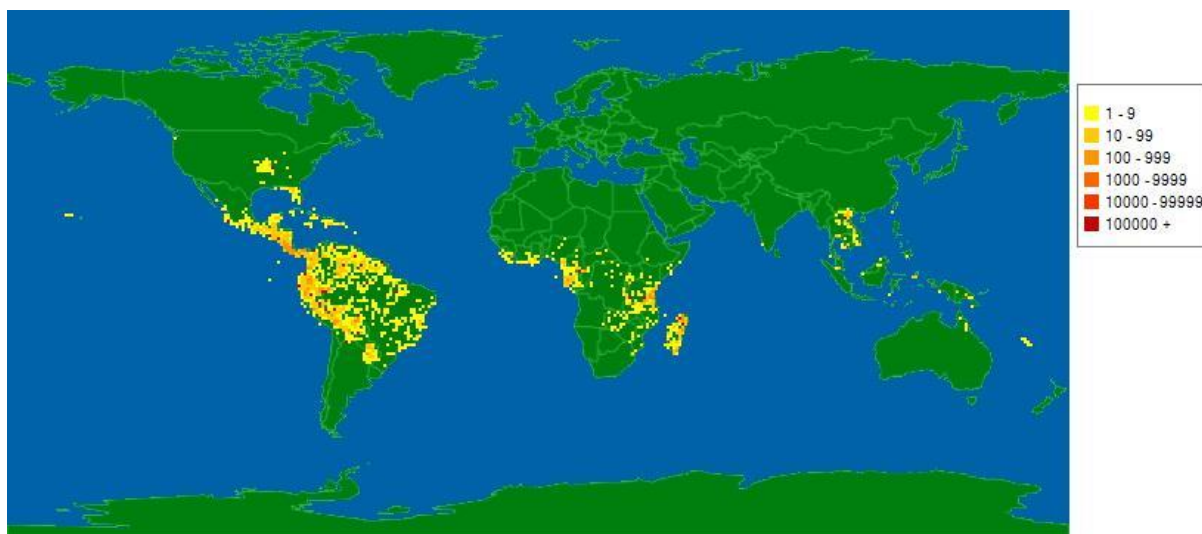
- a) Obter os extratos, utilizando o metanol como solvente extrator de folhas e sementes;
- b) Otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas utilizando a fonte de ionização por ESI-MS;
- c) Otimizar os parâmetros de massas por DESI-MSI utilizando os tecidos de folhas e sementes;
- d) Identificar e obter as imagens de distribuição dos íons dos alcaloides em folhas e sementes através da DESI-MSI.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae Juss possui o maior número de espécies na ordem das Magnoliales. São plantas que apresentam distribuição pantropical, sendo encontradas principalmente na América Latina, África e Ásia (FIGURA 1), já foram classificados cerca de 135 gêneros e mais de 2000 espécies nesta família (CHATROU et al., 2012). No Brasil são encontrados 29 gêneros e 260 espécies, sendo distribuídas por todo território nacional (FORZZA, 2010). Devido a fácil adaptação desta família a diferentes condições edafoclimáticas, elas podem ser cultivadas comercialmente para a produção de frutos e madeira, tendo importância nutricional e comercial para a população (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014; SÃO JOSÉ et al., 2014).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA FAMÍLIA ANNONACEAE JUSS NO MUNDO.



FONTE: www.tropicos.org; Acesso em: nov. 2015

A família Annonaceae é classificada em quatro subfamílias; Anaxagoreoideae, Annonoideae, Ambavioideae e Malmeoideae. No Brasil a subfamília Annonoideae é mais prevalente com cerca de 12 gêneros nativos, entre estes os gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e o *Xylopia* são os que possuem a maior diversidade de espécies (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

3.1.1 Gênero *Annona* Linn.

Na subfamília Annonoidae, o gênero *Annona* Linn é o mais estudado, sendo representado por espécies cultiváveis, como a *Annona muricata* (Graviola), *Annona squamosa* (Fruta do conde) e *Annona cherimola* x *Annona squamosa* (Atemoia), que é uma espécie híbrida, que combina outras duas espécies de anonas, a *A. squamosa* e *A. cherimola*.

O gênero *Annona* Linn. possui atualmente cerca de 200 espécies tropicais, compreendendo também 44 espécies do antigo gênero *Rollinia* que foram realocados no gênero *Annona* por H. Rainer em 2007, baseado em estudos morfológicos, cardinológicos e palinológicos. Este gênero é conhecido pela produção de frutos com sinocarpo carnoso e com algumas exceções que possuem carpídios livres. O carpídio é uma das unidades separáveis de um fruto múltiplo, os carpídios livres podem ser observados em frutos de espécies como o *Ananas sp.* (abacaxi) e *Fragaria sp.* (morango) (MAAS; WESTRA, 1992; RAINER, 2007).

Entre os diversos estudos com espécies do gênero *Annona*, existem relatos de diversos usos destas espécies na medicina tradicional, alguns exemplos podem ser observados na TABELA 1 abaixo.

TABELA 1 - ESPÉCIES UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR E SUA INDICAÇÃO.

(continua)

| Espécie | Nome popular | Parte da planta | Indicação |
|-----------------------|----------------|---------------------------|---|
| <i>A. muricata</i> | graviola | folhas | dores nas costas, diabetes (TSABANG et al., 2012) |
| <i>A. squamosa</i> | fruta-do-conde | folhas | vômitos, dores musculares, cansaço, febre, desordens intestinais, doenças de pele (BOSCOLO; DE SENNA VALLE, 2008) |
| <i>A. salzmanii</i> | araticumapé | folhas, sementes e raízes | verminoses, disenteria, úlceras, inflamações (AGRA, 1977) |
| <i>A. crassiflora</i> | araticum | sementes e folhas | câncer, mordida de cobra, doenças venéreas (PAULO et al., 1992) |
| | | folhas | tônico e adstringente (VILAR; FERRI; CHEN-CHEN, 2011) |

TABELA 1 - ESPÉCIES UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR E SUA INDICAÇÃO.

(conclusão)

| Espécie | Nome popular | Parte da planta | Indicação |
|------------------------|--------------|-----------------|---|
| <i>A. diversifolia</i> | anona branca | folhas | analgésico, anti-inflamatório (CARBALLO et al., 2010) |
| | | frutos | doenças de pele (BARRECA et al., 2011) |
| <i>A. cherimola</i> | cherimóia | sementes | inseticida, antiparasitária (KIM et al., 2001) |

FONTE: O autor (2016).

Além destas publicações que reforçam o conhecimento popular deste gênero, existem relatos que descrevem substâncias provenientes do metabolismo secundário deste gênero, que possuem diversas atividades biológicas, como os alcaloides, acetogeninas, flavonoides e terpenos (DUTRA et al., 2012; MATSUSHIGE et al., 2012; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; SIQUEIRA, 2010; SUN et al., 2014; VEGA et al., 2007).

Embora existam muito estudos relacionados a este gênero, uma grande parcela de espécies ainda não foi explorada cientificamente, sendo que muitas destas espécies são utilizadas na medicina popular sem o conhecimento químico e farmacológico. A falta destes conhecimentos pode trazer um grande risco para a população, por isso existe o interesse em estudos para identificar os compostos de espécies deste gênero.

3.1.2 *Annona rugulosa*

A *Annona rugulosa* é uma árvore nativa brasileira de até 12 metros de altura, como mostrado na FIGURA 2, possuindo vários nomes populares como “araticum-de-porco”, “araticum-verde” ou “araticum-de-comer”. Esta espécie faz parte do gênero *Annona* e pode ser encontrada nas regiões Sul e Sudeste com uma ocorrência maior nas áreas de Floresta Ombrófila Mista, a Floresta de Araucárias. Esta espécie também é uma espécie ornamental, capaz de produzir frutos comestíveis semelhantes a outras espécies do gênero, como a fruta-do-conde, a anona e a graviola (DICKEL; RATES; RITTER, 2007).

FIGURA 2 - EXEMPLAR DE *Annona rugulosa* LOCALIZADO EM CURITIBA/PR.



FONTE: O autor (2014)

A infusão das folhas de *Annona rugulosa* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de dores renais e infecções de garganta (DICKEL; RATES; RITTER, 2007). Embora esta espécie seja utilizada pela população, há somente um relato do estudo fitoquímico das folhas, onde foram isolados e caracterizados treze alcaloides. Entretanto, ainda não existe nenhum relato científico sobre a atividade biológica da *Annona rugulosa* (VENDRAMIN et al., 2013).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários, ao contrário dos metabolitos primários, são compostos encontrados em grupos específicos de organismos, que são expressos individualmente em cada espécie, como por exemplo vegetais, fungos e alguns animais. Os metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com a sua rota de biossíntese e estrutura, as principais classes estudadas são os alcaloides, os terpenos, os poliketídeos, os flavonoides e compostos esteroidais. Além das

atividades biológicas associadas a estes compostos, os metabólitos secundários também são utilizados para determinar a identidade de espécies (DEWICK, 2001; MANN, 1994).

A função e o benefício dos metabólitos secundários para as plantas ainda não são bem esclarecidos, porém, algumas funções são atribuídas empiricamente, como é o caso da produção de compostos tóxicos na defesa contra predadores, de compostos voláteis ou coloridos, que são distribuídos nas partes reprodutivas das plantas com o objetivo de atrair polinizadores. Porém, ainda são necessários mais estudos nas áreas de ecologia química e biologia para justificar a presença destes compostos nas plantas (DEWICK, 2001; SIMÕES et al., 2001).

Há muitos fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários, os principais são ligados a fatores edafoclimáticos, poluição atmosférica, estímulos mecânicos e também a simbiose com patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Esses fatores podem influenciar a quantidade e as classe de compostos que serão sintetizados pelas plantas (até mesmo de espécies semelhantes), isto pode causar diferenças no perfil químico e na quantidade de compostos das plantas coletadas. Este conhecimento é necessário, pois os metabólitos secundários são os principais responsáveis pela atividade farmacológica dos produtos naturais (CANNAS et al., 2016; TAVARES et al., 2013).

3.2.1 Alcalóides: biossíntese e atividade biológica

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas, encontradas em muitas plantas superiores. Nestas moléculas podem ser encontrados um ou mais átomos de nitrogênio, sendo possível observar a formação de aminas primárias, secundárias ou terciárias. Estas estruturas conferem propriedade básica aos alcalóides, facilitando a extração e a posterior purificação devido a sua capacidade de formar sais solúveis em água na presença de ácidos inorgânicos e orgânicos (DEWICK, 2001; SIMÕES et al., 2001).

Eles são classificados de acordo com a sua rota de biossíntese que dependem dos aminoácidos precursores que fornecem a porção do esqueleto fundamental da estrutura com nitrogênio. Entre as principais classes existentes, podemos ressaltar alguns exemplos como os alcaloides indólicos e quinolinicos

derivados do aminoácido triptofano; os protoalcaloides, alcaloides isoquinolínicos e benzilisoquinolínicos que são derivados do aminoácido tirosina; e também os alcaloides que são derivados do aminoácido ornitina como os pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. (KUTCHAN, 1995).

Na TABELA 2 abaixo é possível relacionar alguns alcaloides extraídos de fontes naturais com a suas respectivas atividades biológicas.

TABELA 2 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALCALOIDES EXTRAÍDOS DE FONTES E SUAS RESPECTIVAS CLASSES

(continua)

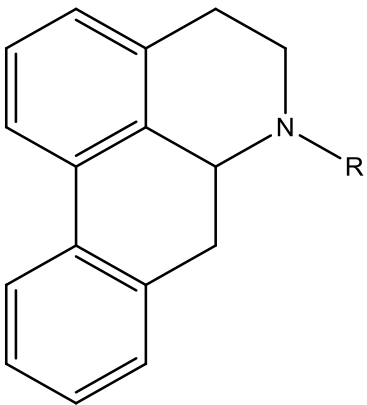
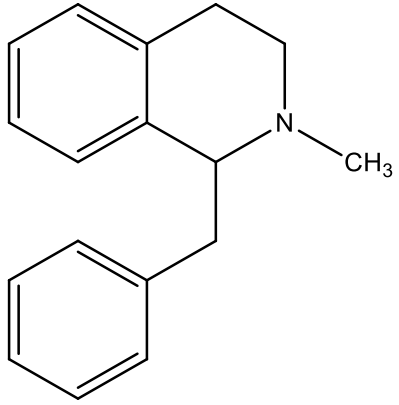
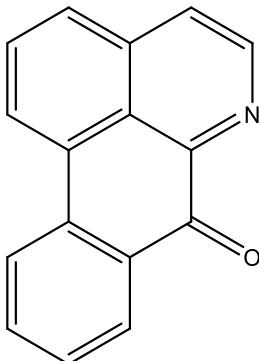
| Alcaloides | Atividades biológicas | Classe |
|--------------|--|--|
| Dicentrina | Hipotensor, redutor de lipídeos e antitumoral (HUANG et al., 1998; YU et al., 1992) |  <p>Aporfínicos</p> |
| Anonaina | Atividade antimicrobiana e inseticida (BETTARINI et al., 1993) | |
| Nornantenina | Inibidor da ciclooxygenase 1 (COY BARRERA; CUCA SUÁREZ, 2010) | |
| Asimilobina | Atividade antimalárica (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993) | |
| Reticulina | Atividade antifúngica, Potente depressor do SNC, antiagregante plaquetária (CHEN et al., 2000; MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998; PAULO et al., 1992) |  <p>Benzilisoquinolínicos</p> |

TABELA 2 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALCALOIDES EXTRAÍDOS DE FONTES E SUAS RESPECTIVAS CLASSES

(conclusão)

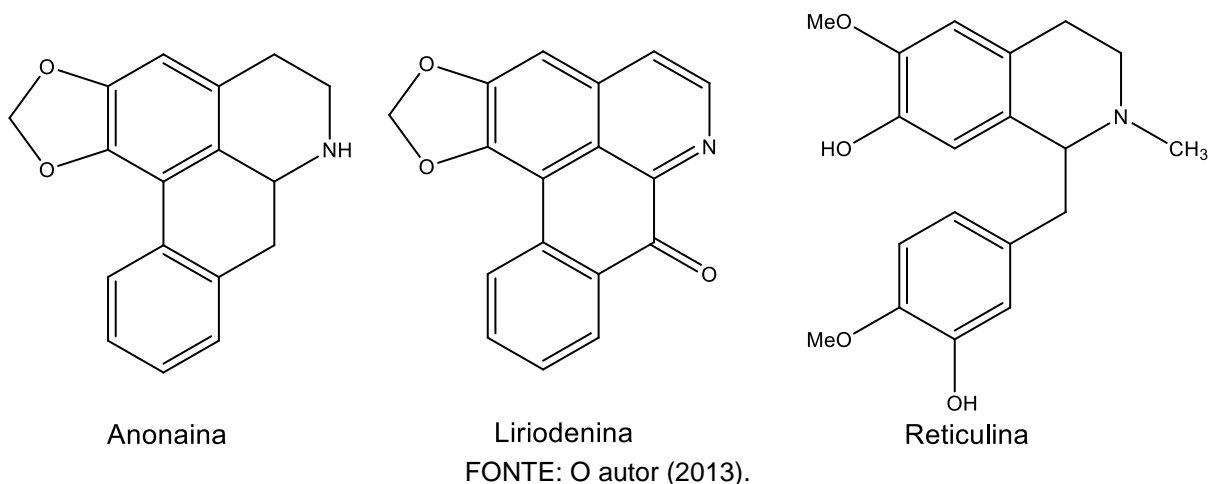
| Alcaloides | Atividades biológicas | Classe |
|-----------------|--|--|
| Liriodenina | Atividade antimicrobiana, Antiagregante plaquetária em antiplasmódica (CHEN et al., 2000; COSTA et al., 2013; RABELO et al., 2014) |  Oxoaporfínico |
| Lisicamina | Atividade antiplasmódica (RABELO et al., 2014) | |
| Aterospermidina | Atividade citotóxica e tripanocida (COSTA et al., 2011; STEVIGNY; BAILLY; QUETIN-LECLERCQ, 2005) | |

FONTE: O autor (2016).

Como apresentado na TABELA 2, os alcaloides agem em diversos sítios farmacológicos, por isso são considerados os metabolitos secundários com maior número de atividades biológicas que ocorrem na natureza, que já foram relatadas na literatura.

A família Annonaceae se caracteriza por apresentar em sua composição, uma grande quantidade de alcaloides provenientes da via biossintética do ácido chiquímico, derivados do aminoácido tirosina, como os protoalcaloides e alcaloides isoquinolínicos. Entre os alcaloides isoquinolínicos, os aporfínicos são o maior grupo, seguido do grupo dos oxaporfínicos, sendo também encontrados grupos menores como os fenantrênicos, benziltetrahydroisoquinolínicos e bisbenziltetrahydroisoquinolínicos. Os alcaloides anonaina, lirodenina e reticulina (FIGURA 3) são os que prevalecem no gênero *Annona*, por isso são considerados como marcadores quimiotaxonômicos deste gênero (LEBOEUF et al., 1980).

FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS MARCADORES QUIMIOTAXONOMICOS DO GENERO ANNONACEAE.



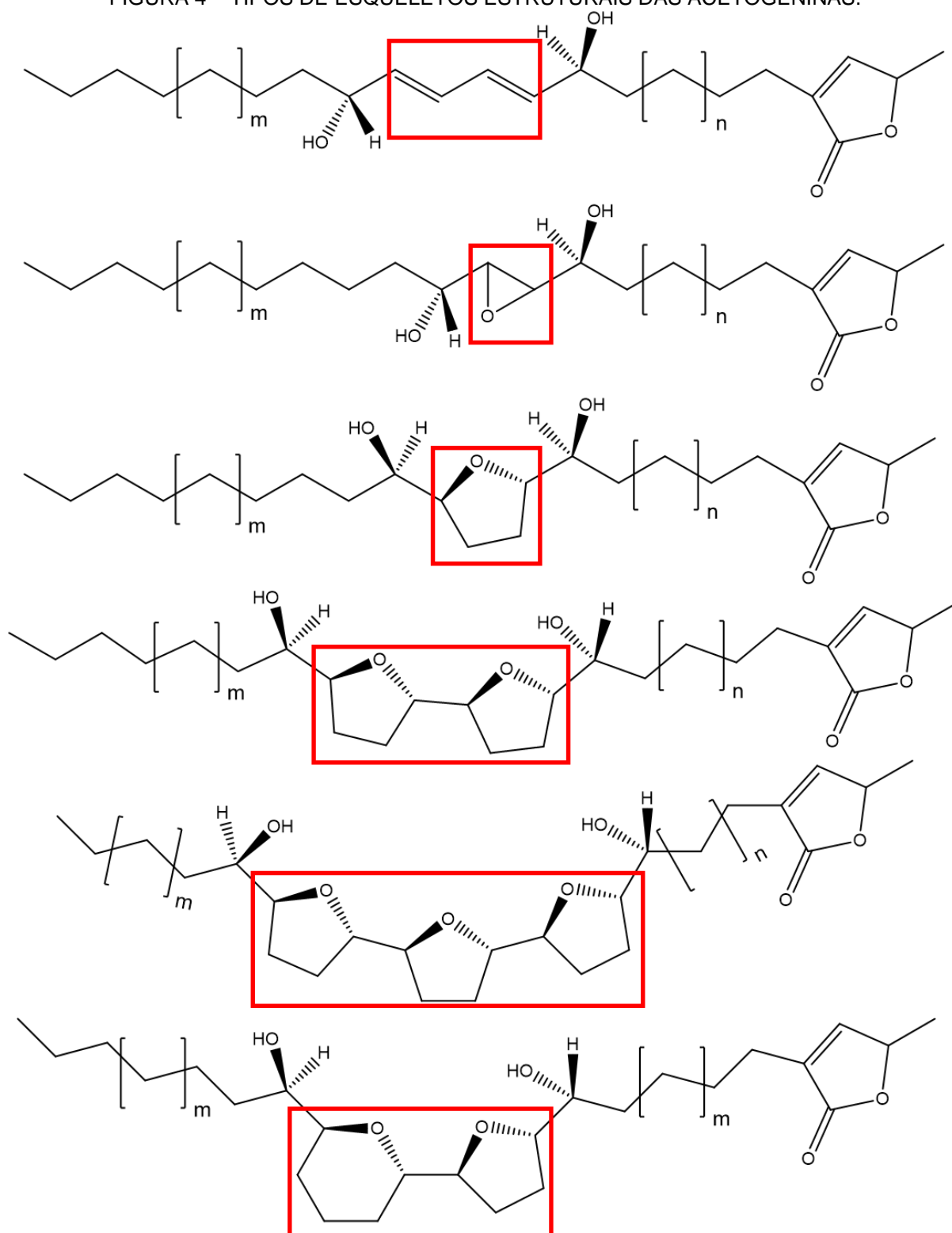
Em estudo recente com as folhas de *Annona rugulosa* foram identificados 13 alcalóides, sendo oito alcalóides aporfínicos: anonaína, nornantenina, *N*-nornuciferina, xilopina, norisocoridina, litseferina, assimilobina e isoboldina; dois alcaloides oxoaporfínicos: lanuginosina e liriodenina; e três alcalóides benziltetrahydroisoquinolínicos: magnocolina, reticulina e *N*-metilcoclaurina. Através das informações da TABELA 2, é possível sugerir que o extrato das folhas de *Annona rugulosa* possa ter algum tipo de atividade biológica devido à presença destes alcaloides em sua constituição química (VENDRAMIN et al., 2013).

3.2.2 Acetogeninas: biossíntese e atividade biológica

Além dos alcaloides, as anonáceas são conhecidas por serem capazes de produzir uma classe de metabólitos secundários singular, conhecida como acetogeninas (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999).

As acetogeninas são um grupo de moléculas formado por uma longa cadeia carbônica, geralmente com 35/37 carbonos, conjugada com um anel γ -lactona terminal. Elas ainda são classificadas de acordo com os grupamentos funcionais em sua cadeia, como a presença de um ou mais anéis tetrahydrofuranos (THF), ligações duplas, anéis tetrahydropirano, cetonas, hidroxilas, anéis epóxi e/ou acetoxilas, como exemplificado na FIGURA 4 abaixo (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999; GALLIMORE, 2009; HENNING, 1966).

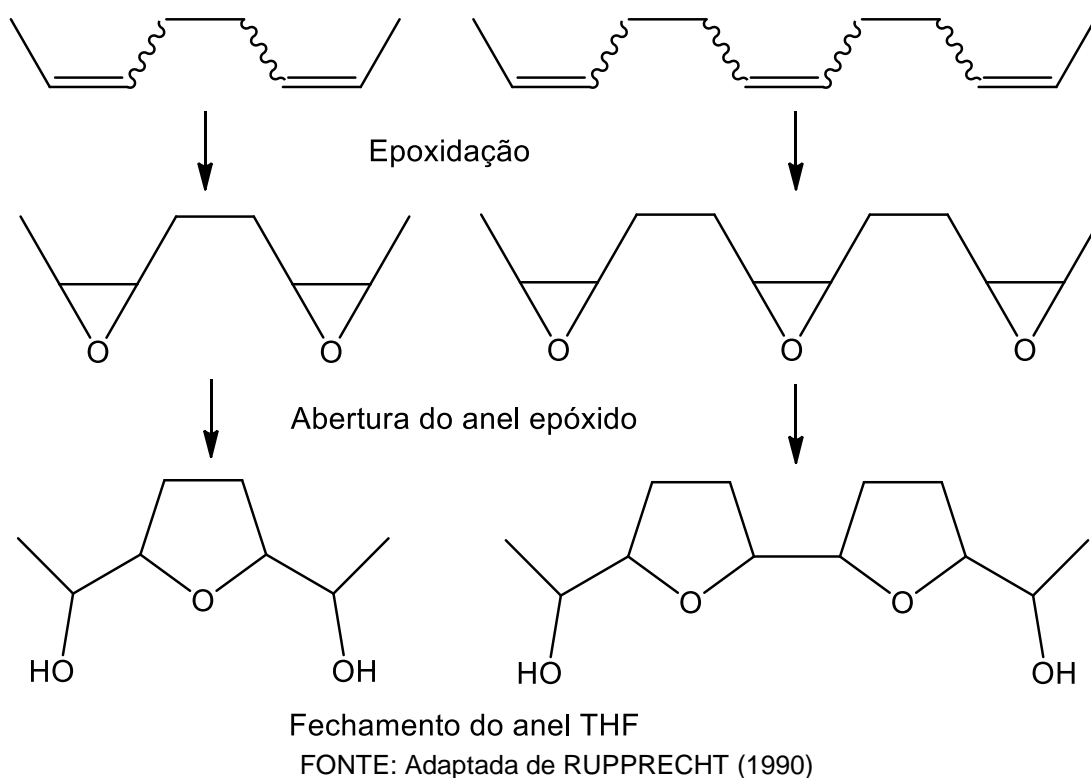
FIGURA 4 – TIPOS DE ESQUELETOS ESTRUTURAIS DAS ACETOGENINAS.



FONTE: O autor (2016).

As modificações funcionais na cadeia carbônica sugerem que as acetogeninas são derivadas da rota metabólica dos policetídeos, onde há a combinação de moléculas pelas vias do acetil-CoA, malonil-CoA e propianil-CoA, com dois ou três carbonos lineares, como o ácido acético e o ácido propanoico, similar a biossíntese dos ácidos graxos. Os anéis THF são formados a partir da epoxidação das ligações duplas da cadeia seguida da abertura dos anéis epóxido e fechamento do anel THF, como exemplificado na FIGURA 5 abaixo. (DEWICK, 2001; RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990).

FIGURA 5 - PROVÁVEL VIA DA BIOSÍNTESE DOS ANÉIS THF DAS ACETOGININAS.



As acetogeninas foram descritas pela primeira vez em 1982, onde Tempesta et. al. isolou pela primeira vez a uvaricin, proveniente das raízes da *Uvaria accuminata*. Hoje já estão descritos mais de 500 variedades de acetogeninas isoladas em diversas plantas da família Annonaceae (BERMEJO et al., 2005; LIAW et al., 2010).

Para o isolamento das acetogeninas, geralmente as folhas, sementes, caules e raízes são maceradas com etanol/água, embora também existam relatos na literatura utilizando a maceração com metanol e diclorometano. Após a maceração o

extrato hidro alcoólico é seco e submetido a uma partição líquido-líquido com clorofórmio e água. A fração clorofórmio é então submetida a outra partição líquido-líquido com hexano e metanol, sendo que as acetogeninas podem ser encontradas em maior concentração na fração metanol (CHANG et al., 2003; GU et al., 1999; RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990).

O grande interesse no estudo das Acetogeninas é seu potencial biológico. As Acetogeninas são conhecidas como inibidores do complexo I do transporte mitocondrial de elétrons da cadeia respiratória (NADH: ubiquinone oxiredutase) em células de mamíferos e de insetos, este mecanismo de ação relaciona-se com as capacidades citotóxicas e antitumorais destas moléculas (CHEN et al., 2013; LONDERSHAUSEN et al., 1991; PAUL et al., 2013).

A atividade antitumoral das acetogeninas já foi comprovada, testes em algumas linhagens de células tumorais como câncer de fígado, mama, próstata e cólon mostraram atividades fortes e moderadas quando comparadas aos controles positivos e também mostraram seletividade à algumas linhagens. (CHEN et al., 2013; GU et al., 1997; LIAW et al., 2010, 2002)

Além da atividade antitumoral, testes biológicos com várias espécies de larvas e mosquitos adultos, incluindo o mosquito vetor da dengue *Aedes aegypti*, mostraram promissora atividade inseticida e larvicida (GRANADOS et al., 2001; KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014; MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

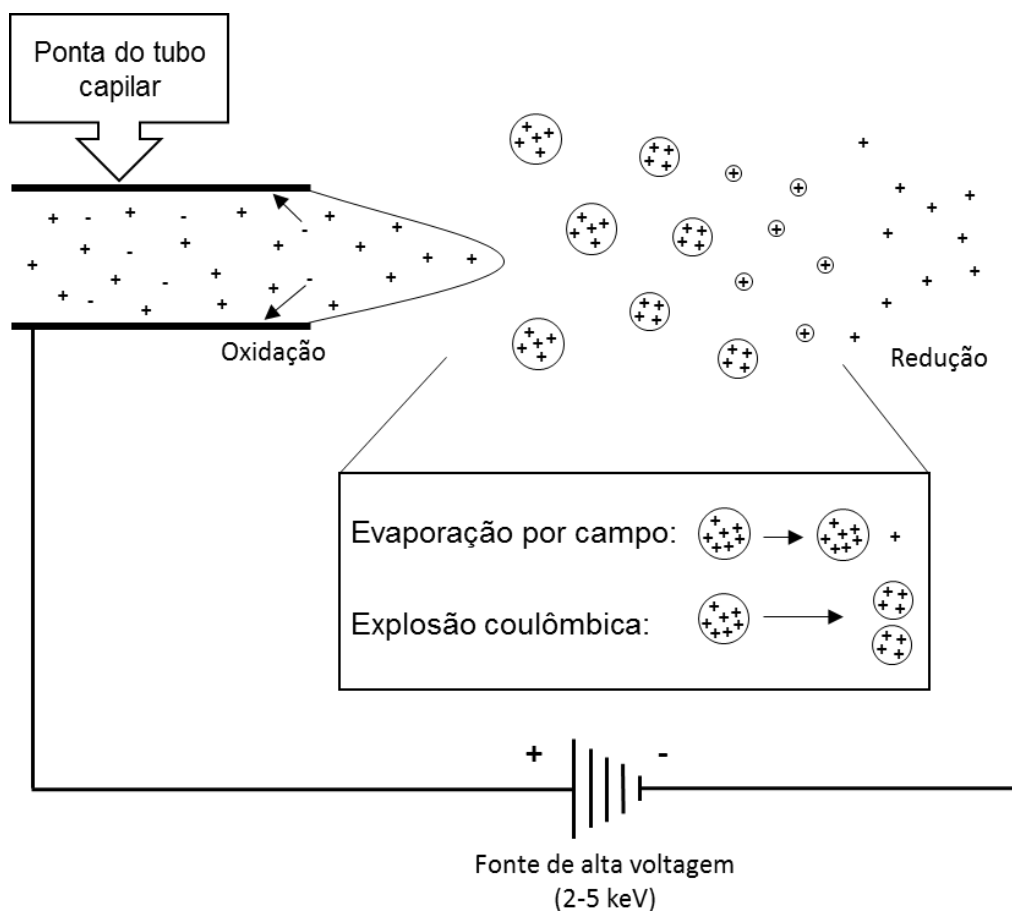
3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.3.1 Ionização de dessorção por *eletrospray* (DESI)

A fonte de ionização é o primeiro componente do espectrômetro de massas, é onde as moléculas são ionizadas, positivamente ou negativamente, para posteriormente serem analisadas e detectadas. A ionização pode ocorrer sob vácuo ou pressão atmosférica isto depende do tipo de fonte de ionização utilizada. Além disso, as fontes são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ionização, elas podem ser por impacto eletrônico (EI), ionização química (CI), eletrospray (ESI), dessorção (MALDI, FAB, SIMS) (FENN et al., 1989; KARAS; BACHMANN; HILLENKAMP, 1985; PAVIA et al., 2009).

Após 15 anos da invenção da fonte ESI por Fenn et.al., 1989, uma nova fonte ionização conhecida por DESI deu início a um grupo de técnicas que possibilita a formação de íons em condições ambientais. A DESI é uma fonte que foi originada a partir da ESI. Na fonte ESI a amostra é dissolvida e inserida na fonte através de infusão direta ou CLAE com um fluxo constante. A solução é borrifada através de um capilar com um potencial de alta voltagem para dentro de uma câmara aquecida e em pressão atmosférica, onde há a formação de gotículas carregadas, auxiliado por um gás, o solvente é evaporado aumentando a densidade de carga de cada gotícula até que haja a repulsão das cargas por forças eletrostáticas, dividindo as gotículas em gotículas menores (FIGURA 6), até que os íons fiquem no estado gasoso, sendo enviados para o analisador de massas através do vácuo (FENN et al., 1989).

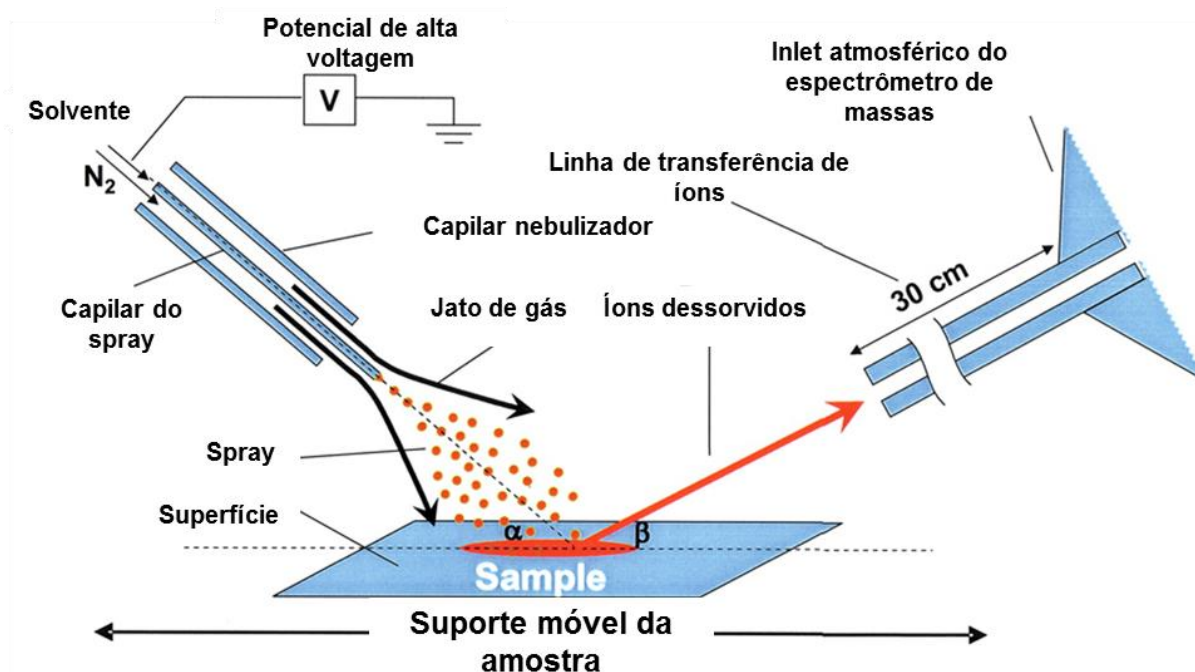
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (ESI).



FONTE: Adaptada de GROSS (2004).

Diferente da ESI, a ionização através da fonte DESI ocorre em temperatura ambiente com mínimo ou nenhum preparo de amostra. O mecanismo de funcionamento da DESI (FIGURA 7) ocorre através da incidência do spray, com um ângulo de contato, as gotículas carregadas incidem na superfície da amostra ocorrendo a ionização dos analitos, em seguida gotículas secundárias promovem a dessorção e a transferência, através do vácuo, dos analitos para o analisador de massas (TAKÁTS et al., 2004; VESSECCHI et al., 2011).

FIGURA 7 – MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA DESI.



FONTE: Adaptada de TAKÁTS (2004)

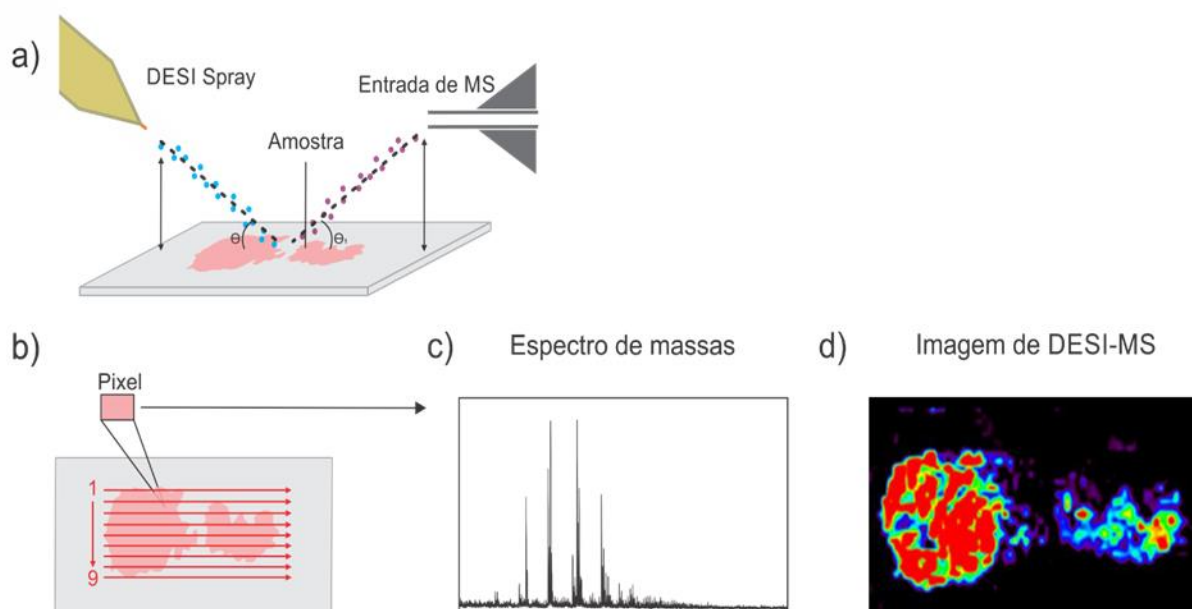
A DESI é uma fonte versátil que preserva a amostra, podendo ser utilizada em vários campos das ciências, como na farmácia, química, biologia e em análises forenses. No estudo desenvolvido por Talaty, 2005, foram identificados diversos alcaloides diretamente no tecido vegetal de três espécies de plantas, com mínimo preparo de amostra. Além disso, também existe a possibilidade de analisar metabólitos em colônias de fungos e bactérias como nos trabalhos realizados por Sica, 2014 e Jackson, 2008 (JACKSON et al., 2008; SICA et al., 2014; TALATY; TAKÁTS; COOKS, 2005).

Devido a sua capacidade de ionização por dessorção, esta técnica também permite a formação da MSI na superfície da amostra. No estudo realizado por Müller, 2011, foi realizada a identificação rápida e o mapeamento dos produtos de degradação da clorofila em *imprints* das folhas de batata. Através da utilização da DESI-MSI foi possível identificar quais os principais produtos de degradação e a sua localização espacial nas folhas da batata. A DESI também pode ser utilizada para realizar análises de perfis de lipídios em tecidos de animais, como por exemplo o trabalho de Seng, 2014 onde foi possível realizar a identificação de 30 lipídios diretamente de lentes de olhos humanos, além disso esta técnica pode fornecer informações farmacológicas, como a distribuição de drogas em tecidos de animais.

Está funcionalidade foi apresentado no trabalho de Wiseman, 2008. Além destes exemplos, existem muitas outras aplicações já relatadas na literatura (MÜLLER et al., 2011; SENG et al., 2014; VESSECCHI et al., 2011; WISEMAN et al., 2008).

No mapeamento por espectrometria de massas (FIGURA 8 - d), a superfície da amostra é dessoarvida e ionizada (a) em cima de uma plataforma móvel onde a amostra é escaneada (b), obtendo-se os espectros de massas (c), cada espectro obtido representa um pixel da imagem, então estes espectros são combinados de acordo com as coordenadas x e y fornecidas pela imagem ótica, sendo formada a imagem química (d) correspondente (IFA et al., 2007; SCHRAMM et al., 2012).

FIGURA 8 - PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MSI DE ÍONS UTILIZANDO A DESI.



FONTE: SCHWAB (2015).

A DESI-MSI também pode ser utilizada como uma técnica semi-quantitativa, embora não seja possível determinar a quantidade exata dos analitos, através da proporção relativa da intensidade do sinal dos analitos é possível ter uma noção da concentração do analito estudado (TAKÁTS; WISEMAN; COOKS, 2005).

A DESI não é a única técnica de ionização que permite a obtenção de imagens através da dessorção da amostra, além da DESI existe a espectrometria de massas de íons secundários (SIMS) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Estas técnicas possuem uma vantagem em relação a resolução das imagens (pixels por cm^2).

Na DESI é possível alcançar uma resolução de imagem de aproximadamente 150 a 200 μm por pixel, já para as imagens geradas através da fonte SIMS, é possível obter uma resolução de imagem muito superior, com 2 a 5 μm por pixel e por UV-MALDI é possível obter uma resolução de imagem de 50 a 100 μm por pixel.

Embora estas técnicas gerem imagens com uma resolução maior do que a DESI, o preparo da amostra e a operação destes equipamentos exigem que o operador tenha experiência prévia neste tipo de análise, além disso as amostras são submetidas a alto vácuo, não sendo possível analisar qualquer tipo de amostra. Já a DESI não necessita deste preparo complexo, podendo ser executada em amostras *in natura* e em condições ambientes (GARRETT et al., 2014; GODE; VOLMER, 2013).

3.3.2 Identificação de moléculas por espectrometria de massas

Após a ionização dos analitos, os íons precisam ser separados e detectados. A separação dos íons acontece de acordo com a sua relação massa/carga (m/z), esta separação depende do tipo de analisador utilizado no equipamento. Atualmente existem duas classes de analisadores os que possuem baixa resolução de massas (LRMS) e os que possuem alta resolução de massas (HRMS). Os principais representantes dos analisadores de baixa resolução são os quadrupolos e as armadilhas de íons. Já entre os analisadores de alta resolução podemos citar o analisador por tempo de voo (TOF), o Orbitrap® e o analisador de ressonância ciclônica de íons (ICR). A grande diferença dos analisadores de baixa e alta resolução é a capacidade de separar íons com massas muito próximas (LRMS < 0,1 Da; HRMS < 0,0001 Da) (MÜNZENBERG, 2013; PAVIA et al., 2009).

Através de equipamentos com alta resolução é possível determinar a fórmula molecular dos analitos com base no defeito de massas. O defeito de massas é a diferença entre a massa teórica exata do composto e a massa nominal obtida através do espectro de massas, conforme a equação abaixo, quanto maior for esta diferença, maior será o erro e consequentemente uma quantidade maior de fórmulas moleculares diferentes poderão ser atribuídas ao íon analisado (SLENO, 2012).

$$\text{Eppm} = \frac{[\text{Massa exata (Calculada)} - \text{Massa Experimental}]}{\text{Massa exata (Calculada)}} \times 10^6$$

Além da fórmula molecular, é possível determinar a estrutura da molécula através de experimentos de massas sequencial (fragmentação). Existem muitos tipos de células de fragmentação: dissociação por captura de elétrons (ECD), dissociação por transferência de elétrons (ETD), fotodissociação com laser (IRMPD) entre outras, sendo que a dissociação induzida por colisão (CID) uma das mais utilizadas. De acordo com Vessecchi (2011, p. 4) neste experimento, “a energia interna do íon, aumentada pela colisão com um gás inerte, é dissipada por meio de sua fragmentação.” existem outras variantes como a *high collision dissociation* (HCD) onde o potencial de voltagem utilizada para gerar os fragmento é maior, consequentemente são obtidos fragmentos com *m/z* menores (STOBIECKI, 2000; VESSECCHI et al., 2011).

A detecção dos íons analisados ocorre no estágio final do equipamento de espectrometria de massas, os detectores são responsáveis por transformar os íons em sinais que possam ser interpretados pelo computador. Os detectores mais utilizados são os multiplicadores de elétrons que geralmente são utilizados em equipamentos com analisadores de baixa resolução e os multicanais que são equipados em equipamentos que possuam analisadores de alta resolução (PAVIA et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALITICA

Foram realizadas análises exploratórias dos extratos em MeOH, EtOH, e frações do extrato em EtOH de folhas de *Annona rugulosa* por CCDA, obtidos em 2013 pelo grupo de pesquisa. Para isso, foram utilizadas cromatofolhas com 0,2 mm de espessura de sílica gel 60 da Merck™ em suporte de alumínio, com indicador de fluorescência F₂₅₄ (Sigma-Aldrich, Brasil). O revelador utilizado foi o reagente de Kedde, que consiste de duas soluções: solução A, composta de 3% de ácido 3,5-dinitrobenzóico, e solução B, composta de 5,7% de hidróxido de potássio solubilizado em etanol (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

Os solventes (grau P.A.) utilizados para a fase móvel foram: hexano/clorofórmio/nitroetano/acetato de etila/acetona/metanol/acetonitrila/água na proporção de 12:2:4:4:1:2:1,6:0,1 (v/v/v/v/v/v/v/v) (GRZYBOWSKI, 2011).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os experimentos de *fullscan* dos extratos e análise dos tecidos vegetais, *imprints* e imagens moleculares dos tecidos vegetais foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução híbrido, quadrupolo-orbitrap Q Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, EUA). As análises por infusão direta (ESI-HRMS), foram realizadas através de uma bomba seringa Fusion 100 Classic (Chemyx, EUA) acoplada a uma fonte de Ionização por eletrospray (ESI). E a obtenção das imagens da distribuição dos íons foi realizada através de uma fonte DESI 2D (Prosolia Inc., EUA).

Os dados obtidos foram processados utilizando o software Qual Browser Thermo Xcalibur™ 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific, EUA). A identificação dos analitos foi realizada através do erro de defeito de massas, o critério para a determinação da fórmula molecular foi <5 ppm. Para a obtenção das imagens, os espectros de massas foram convertidos do formato .raw para .img utilizando o software FireFly™ (Prosolia Inc., EUA). Os arquivos .img foram analisados através do software de imagens BioMap (*freeware*, <http://www.maldi-msi.org/>).

Todos os dados foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.

Testes preliminares foram realizados com uma fonte DESI 1D (Prosolia Inc., EUA), acoplada a um espectrômetro de massas com analisador do tipo armadilha de íons - LTQ XL™ (Thermo Fisher Scientific, EUA). Estes foram executados no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

4.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

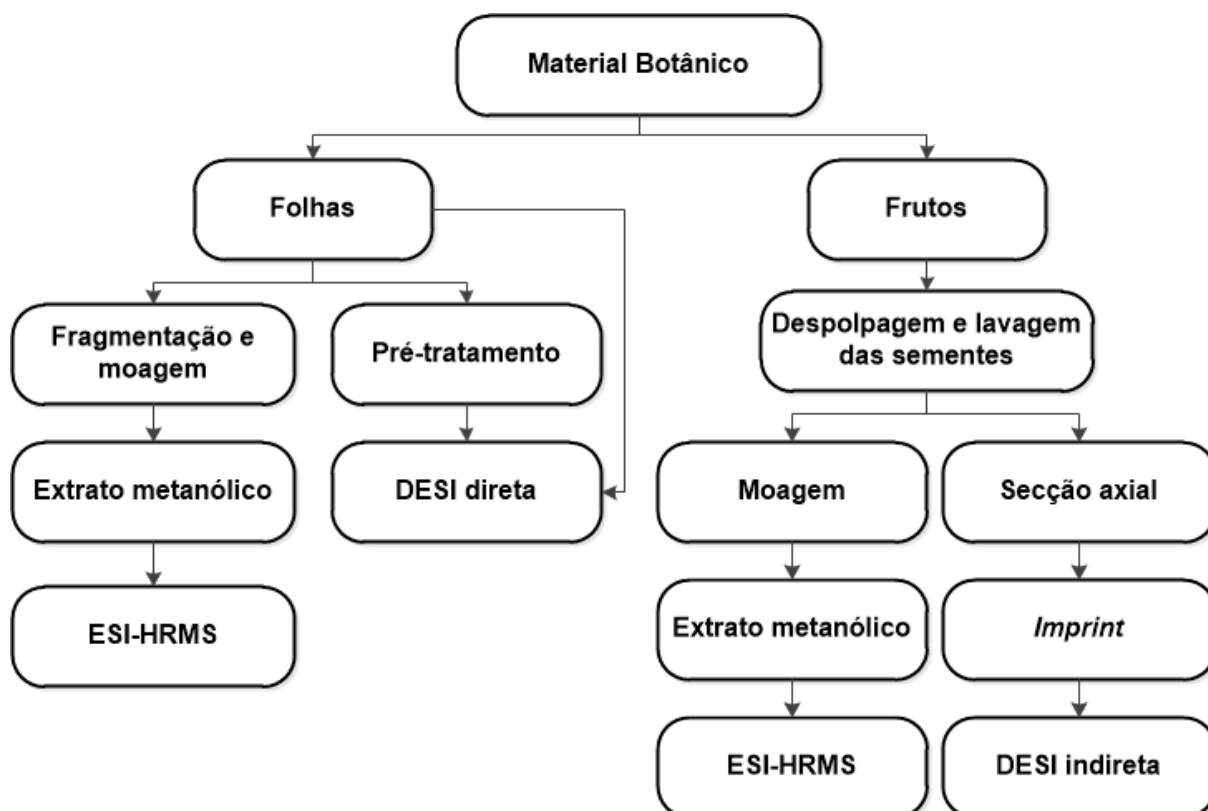
As folhas e frutos de *Annona rugulosa* foram coletadas em Curitiba, Paraná (coordenadas 25°23'56.10" S e 49°15'08.81" O), nos meses de novembro de 2014 e janeiro de 2015, respectivamente. O material botânico coletado foi comparado com uma exsicata depositada no Herbário UPCB, sob o número #1249, Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

Para as análises por DESI direta as folhas coletadas foram congeladas inteiras em tubos do tipo Falcon de 50 mL até a realização das análises.

4.4 PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico foi separado em dois grupos, em um grupo ficaram as folhas e em outro grupo os frutos. As análises de cada grupo foram realizadas conforme a FIGURA 9 abaixo.

FIGURA 9 - PREPARO E ANÁLISE DO MATERIAL BOTÂNICO.



Fonte: O autor (2016).

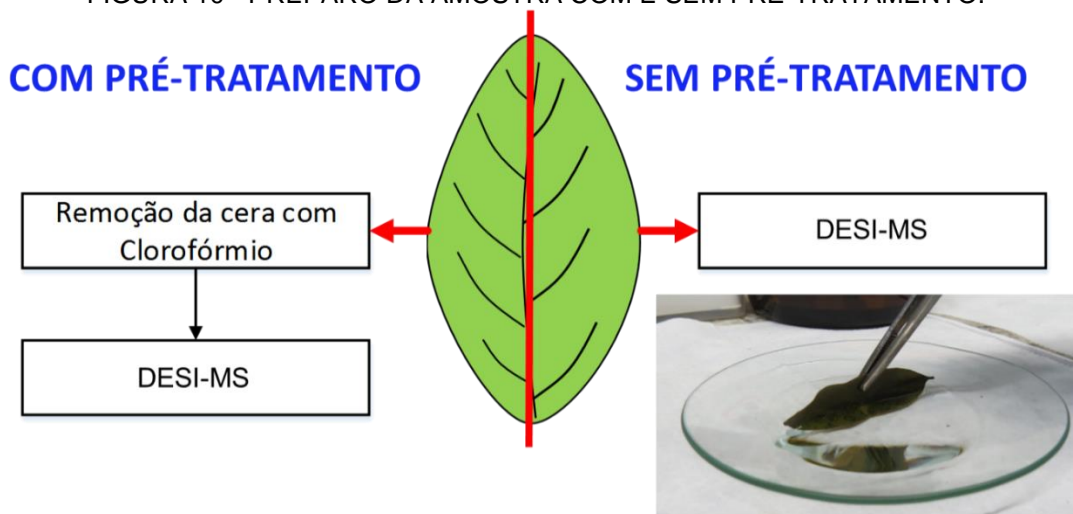
4.4.1 Preparo das folhas para análise por ESI-HRMS e DESI direta

Para as análises por ESI-HRMS, 100 mg de folhas secas em temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) foram fragmentadas, moídas com graal e pistilo. A maceração foi realizada com 1 mL de metanol por 20 minutos. Após o preparo do extrato, este foi centrifugado e o sobrenadante foi diluído a uma concentração de 20 ng.mL⁻¹, em uma solução de metanol (grau HPLC) e água (ultrapura), esta solução foi infundida através de uma bomba seringa através da fonte de ionização por eletrospray (ESI) acoplada ao Q Exactive™.

As MSI's e os *fingerprints* obtidos por DESI direta foram realizados diretamente do tecido das folhas frescas. Para isso dois tratamentos foram realizados: o pré-tratamento com clorofórmio, sendo uma metade da folha lavada com clorofórmio por 3 segundos; e sem o tratamento com clorofórmio (FIGURA 10).

A área total das imagens da folha foi de 4,5 x 1,5 cm, com tamanho do pixel de aproximadamente 200 µm, o tempo total a aquisição da imagem foi de aproximadamente 2 horas.

FIGURA 10 - PREPARO DA AMOSTRA COM E SEM PRÉ-TRATAMENTO.



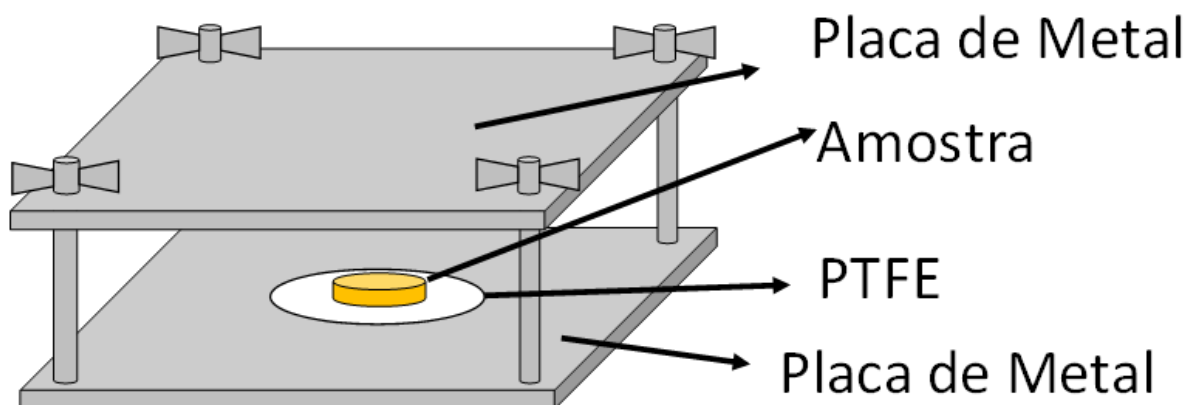
FONTE: O autor (2016).

4.4.2 Preparo das sementes para análise por ESI-HRMS e DESI indireta

As sementes foram despulpadas dos frutos frescos e lavadas em água corrente. O excesso da água foi retirado com papel e colocadas em um dessecador com sílica para secagem (indicador de umidade azul) durante 5 dias, sendo armazenadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL e congeladas até a realização das análises. O preparo dos extratos das sementes foi realizado conforme o item 4.4.1.

Para as análises por DESI indireta, as sementes foram cortadas axialmente e em seguida a parte do endosperma foi colocada em contato com uma membrana de PTFE (poro de 0,22 μm e \varnothing : 47 mm; Allcrom, Brasil) e pressionadas, utilizando duas placas de metal por 12 horas conforme a FIGURA 11 abaixo.

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE IMPRINTING DA SEMENTE.



FONTE: O autor (2016).

Após a obtenção do *imprint* da semente, ele foi colocado sobre a plataforma de apoio da fonte DESI e as MSIs foram obtidas. A área total das imagens foi de 0,9 x 1 cm, com tamanho do pixel de aproximadamente 200 μm , o tempo de aquisição da imagem foi de aproximadamente 35 minutos.

4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

O espectrômetro de massas Q Exactive™ foi calibrado através da fonte ESI, utilizando uma solução de calibração comercial fornecida pelo fabricante. Após a calibração do equipamento, a fonte DESI foi acoplada e a calibração foi verificada no modo positivo de ionização utilizando o íon de m/z 443 da rodamina B, substância presente na tinta vermelha de canetas comuns.

Primeiramente, os parâmetros foram otimizados utilizando os sinais dos alcaloides através da fonte ESI. Em seguida, os mesmos sinais foram utilizados para a otimização da fonte DESI. Na TABELA 3 abaixo, é possível visualizar os parâmetros utilizados para a otimização, assim como, o range dos valores testados para as fontes ESI e DESI.

TABELA 3 - PARAMETROS UTILIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DOS SINAIS DOS ALCALOIDES NO ESPECTROMETRO DE MASSAS Q EXACTIVE™.

| Fonte | Parâmetros | Valores testados |
|---|---|-------------------------------------|
| ESI | Voltagem do capilar | -5 a +5 kV |
| | Temperatura do capilar | 300 a 350 °C |
| | Temperatura da câmara de ionização | 300 a 350°C |
| | Composição do spray (Solvente) | metanol e água |
| | Fluxo | 2 a 8 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ |
| DESI (Direta e Indireta) | Voltagem do capilar | -5 a +5 kV |
| | Temperatura do capilar | 300 a 350 °C |
| | Pressão gás N ₂ | 120 a 200 psi |
| | Composição do spray (Solvente) | metanol e água |
| | Fluxo | 2 a 8 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ |
| | Ângulo de contato do spray (α) | 45 a 55° |
| | Tempo de aquisição | 0,100 a 0,200 s |

FONTE: O autor (2016).

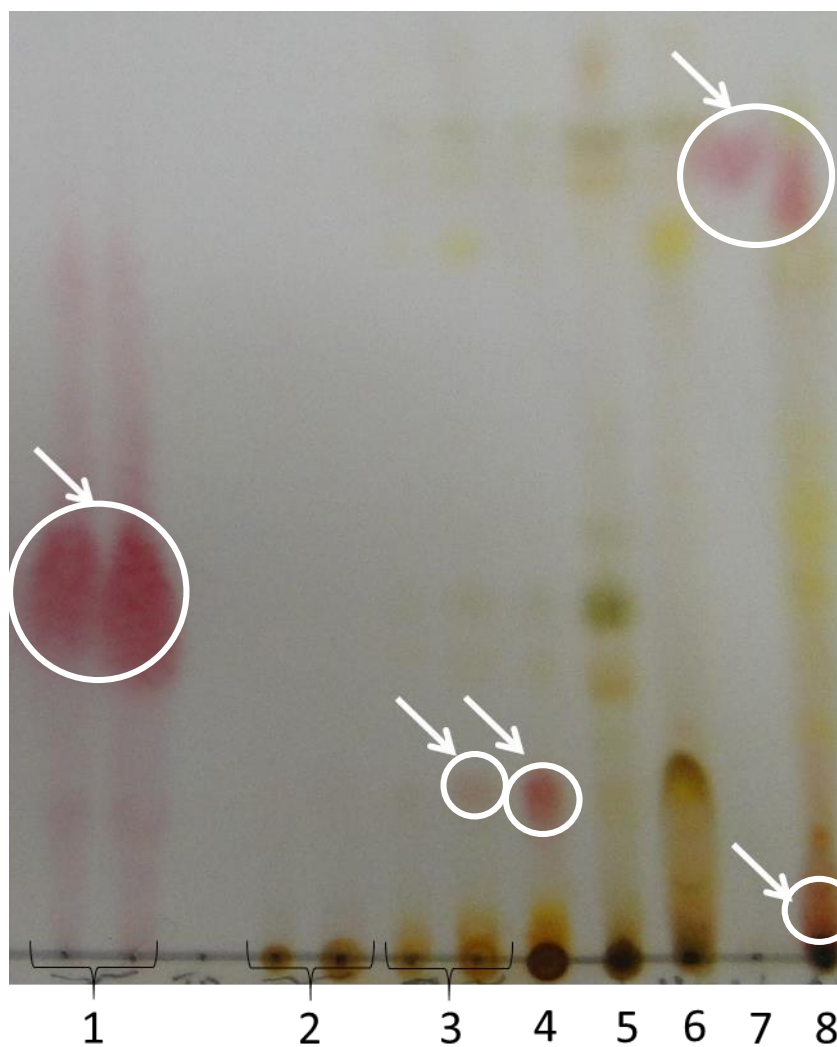
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ANALÍTICA (CCDA).

Em trabalhos anteriores com folhas de *Annona rugulosa* (2013) foram obtidos extratos em MeOH, EtOH, e frações do extrato em EtOH. Nas frações e subfrações previamente analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C verificou-se que além da presença dos sinais dos alcaloides, foram observados sinais que indicavam a presença das acetogeninas. A partir desta suspeita, as amostras foram analisadas por CCDA utilizando como padrão a acetogenina, anonacina. A fase móvel utilizada foi uma solução dos solventes hexano/clorofórmio/nitroetano/acetato de etila/acetona/metanol/acetonitrila/água na proporção 12/2/4/4/1/2/1,6/0,1 (v/v/v/v/v/v/v/v).

A solução do reagente de Kedde foi utilizado como revelador (GRZYBOWSKI, 2011). Este é um revelador específico para compostos que possuem anéis γ -lactona, este tipo de estrutura é comumente encontrado nos esqueletos das acetogeninas. Quando ocorre a reação da γ -lactona com o reagente de Kedde, é possível detectar uma coloração rosa-avermelhada, como pode ser observado nas amostras do padrão de anonacina (1), extrato em EtOH (3), fração em CH_2Cl_2 (4), e fração alcaloídica (6). Interessante observar que nas subfrações (7) e (8) provenientes da fração enriquecida em alcaloides (6) foi possível também detectar a coloração rosa-avermelhada, indicativo da presença de acetogeninas com anéis γ -lactona em suas estruturas (FIGURA 12).

FIGURA 12 – CCDA DO PADRÃO ANONACINA E DE AMOSTRAS DE *A. RUGULOSA* (1); EXTRATO MEOH (2); EXTRATO ETOH (3); FRAÇÃO CH₂CL₂ (4); PRECIPITADO DA FRAÇÃO CH₂CL₂ (5); FRAÇÃO ALCALOÍDICA (6); SUBFRAÇÃO 1 (7); SUBFRAÇÃO 2 (8).



FONTE: O autor (2016).

A partir desta análise foi possível sugerir a presença de moléculas que possuem o anel γ -lactona em sua estrutura. Entretanto, no extrato em MeOH, obtido em 2013, não foi observada a presença das bandas rosa-avermelhadas. Considerando que estas amostras foram preparadas em 2013 e armazenadas em meio líquido na geladeira, pode ter ocorrido a degradação das mesmas. No entanto, o extrato em EtOH e as frações e subfrações que foram liofilizados e analisados muito tempo depois foi possível observar as bandas rosa-avermelhadas. Portanto, novos extratos em MeOH foram obtidos.

5.2 PARÂMETROS ÓTIMIZADOS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Foram realizados testes variando os parâmetros da fonte ESI e DESI com o extrato em MeOH e tecidos das folhas, respectivamente, com o objetivo de obter a melhor intensidade iônica dos metabólitos nos espectros de massas.

Os valores dos parâmetros da fonte ESI e DESI otimizados estão demonstrados na TABELA 3. Estes valores foram mantidos nas análises por infusão direta, DESI direta e indireta.

TABELA 4 – PARÂMETROS OTIMIZADOS NAS FONTES ESI E DESI PARA A ANÁLISE DE ALCALOIDES E ACETOGENINAS.

| Fonte | Parâmetros | Valores OTIMIZADOS |
|---|---|---------------------------------|
| ESI | Voltagem do capilar | +3.9 kV |
| | Temperatura do capilar | 320 °C |
| | Temperatura da câmara de ionização | 350 °C |
| | Composição do spray (Solvente) | metanol/água (9:1, v/v) |
| | Fluxo | 5 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ |
| | Voltagem do capilar | +5 kV |
| DESI (Direta e Indireta) | Temperatura do capilar | 320 °C |
| | Pressão gás N ₂ | 160 psi |
| | Solvente (spray) | metanol |
| | Fluxo | 3 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ |
| | Ângulo de contato do spray (α) | 45° (direta); 50° (indireta) |
| | Tempo de aquisição | 0,139 s |
| | Tamanho do pixel | ~200 μm |

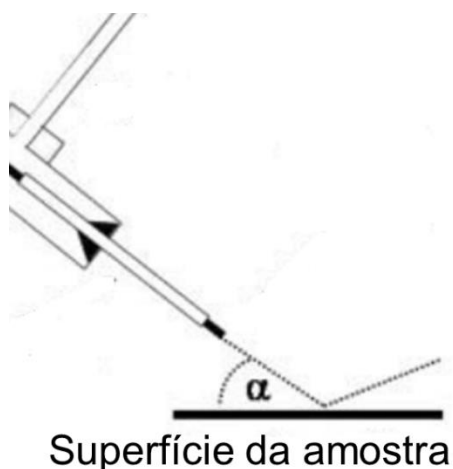
FONTE: O autor (2016).

Os parâmetros que mais influenciaram a estabilidade e a intensidade do sinal na fonte ESI, foram a temperatura da câmara de ionização e a composição do solvente. Estes são parâmetros que interferem diretamente na formação do spray, a temperatura da câmara de ionização está relacionada com a evaporação do

solvente do spray e a composição do solvente com a tensão superficial das gotículas formadas (FENN et al., 1989).

O ângulo de contato (α) do spray e o fluxo do solvente são os parâmetros que mais influenciam na obtenção de espectros para a fonte DESI. O fluxo deve ser constante e com uma velocidade que haja a formação adequada do spray. O ângulo de contato (α) é o que representa a incidência do spray na amostra (FIGURA 13).

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO (α) NA FONTE DESI.



FONTE: Adaptada de VOLNÝ (2008)

A inclinação do ângulo α do spray deve ser otimizada de acordo com a superfície da amostra. As superfícies que não dissipam muita energia (membrana de PTFE) e com ângulo mais agudo são mais vantajosas para análises por DESI-MSI, devido a estabilidade do sinal e da intensidade iônica obtida nas MSIs (VOLNÝ et al., 2008).

No caso de DESI direta em tecidos vegetais, como as folhas lisas, o ângulo α deve ser mais obtuso para que a película de solvente se concentre mais na superfície da amostra, e consequentemente, transferindo uma maior quantidade de energia para as moléculas, estabilizando o sinal e aumentando a intensidade iônica dos íons da amostra (GAO et al., 2010).

5.3 ANÁLISE DE EXTRATOS E TECIDOS DE *Annona rugulosa*

5.3.1 Análise por ESI-HRMS de extratos de folhas e sementes

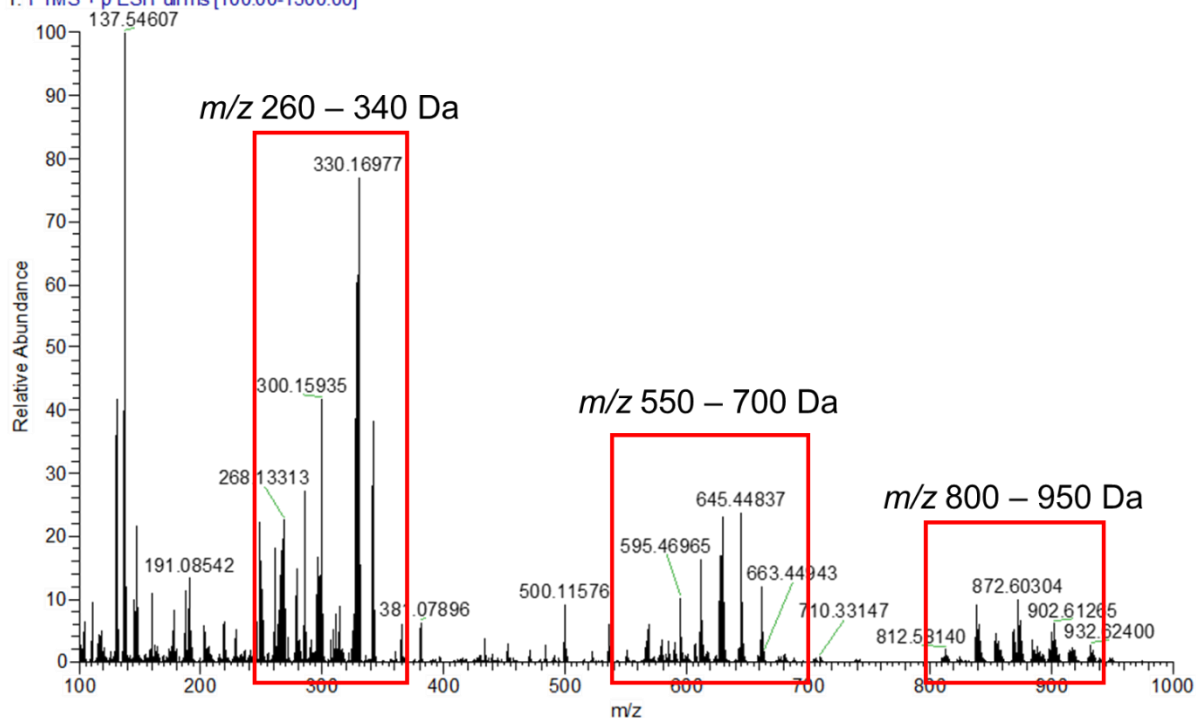
A análise dos extratos em MeOH das folhas e sementes por infusão direta ESI(+)-HRMS foi realizada para confirmar a presença dos íons de alcaloides e acetogeninas. Os espectros de massas *fullscan* foram obtidos no modo positivo de ionização. As moléculas protonadas $[M+H]^+$ foram utilizadas para a dedução das fórmulas moleculares através do defeito de massas e de experimentos de fragmentação.

Analisando o espectro de massas *fullscan* do extrato em MeOH das folhas (ESPECTRO 1), foi possível observar três regiões distintas, massas baixas de íons de m/z 260 a 340 Da, massas médias de íons de m/z 550 a 700 Da e massas altas de íons de m/z 800 a 940 Da. No espectro *fullscan* do extrato em MeOH das sementes foi observada somente uma região de massas médias de íons de m/z 550 a 700 Da (ESPECTRO 2).

Ampliando a região do espectro de íons de m/z 260 a 340 Da (ESPECTRO 3 - B), foi possível identificar onze alcaloides, já no espectro de massas do extrato em MeOH das sementes (ESPECTRO 3 - A) foi identificado somente sete alcaloides (TABELA 5). Os alcaloides apresentaram erro < 5 ppm para os seus defeitos de massas. Estes alcaloides já haviam sido isolados e identificados por RMN de 1H e ^{13}C em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa (Vendramin et al., 2013).

ESPECTRO 1 - FULLSCAN DO EXTRATO EM MEOH DAS FOLHAS DE *A. rugulosa* POR ESI(+)-HRMS.

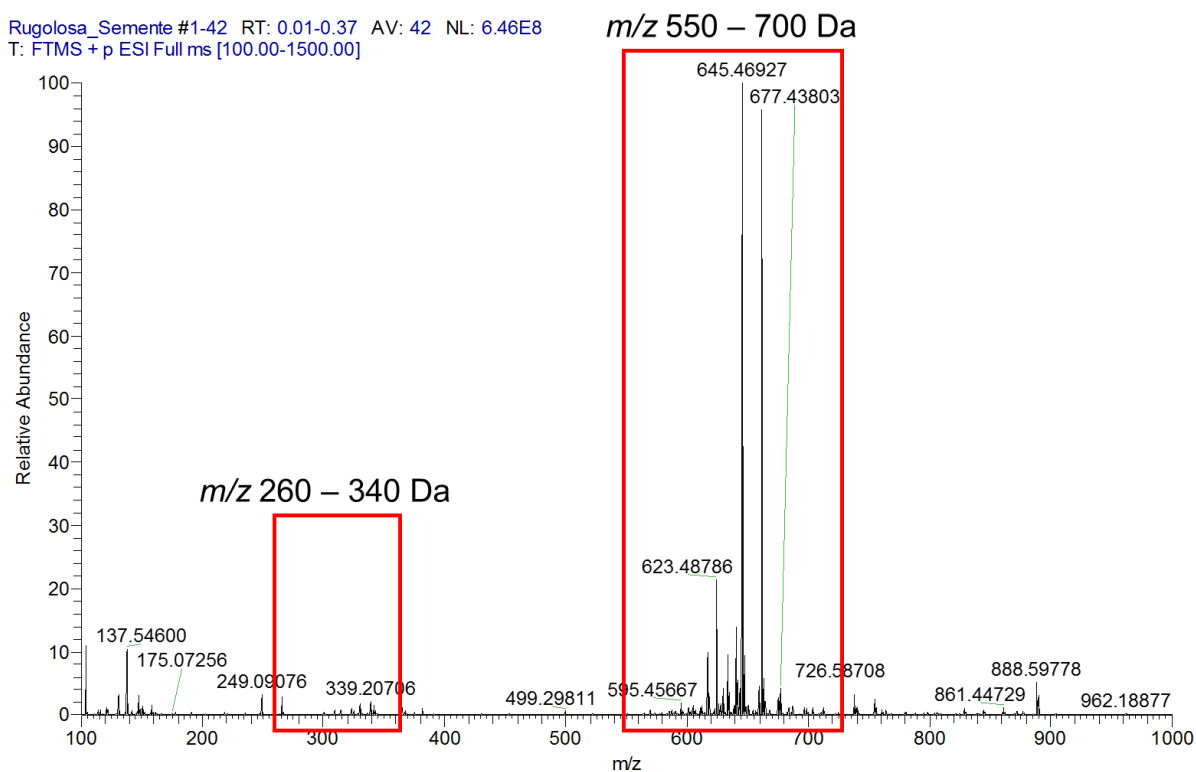
Folha Rugulosa ext MEOH #1-46 RT: 0.01-0.53 AV: 46 NL: 2.78E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]



FONTE: O autor (2016).

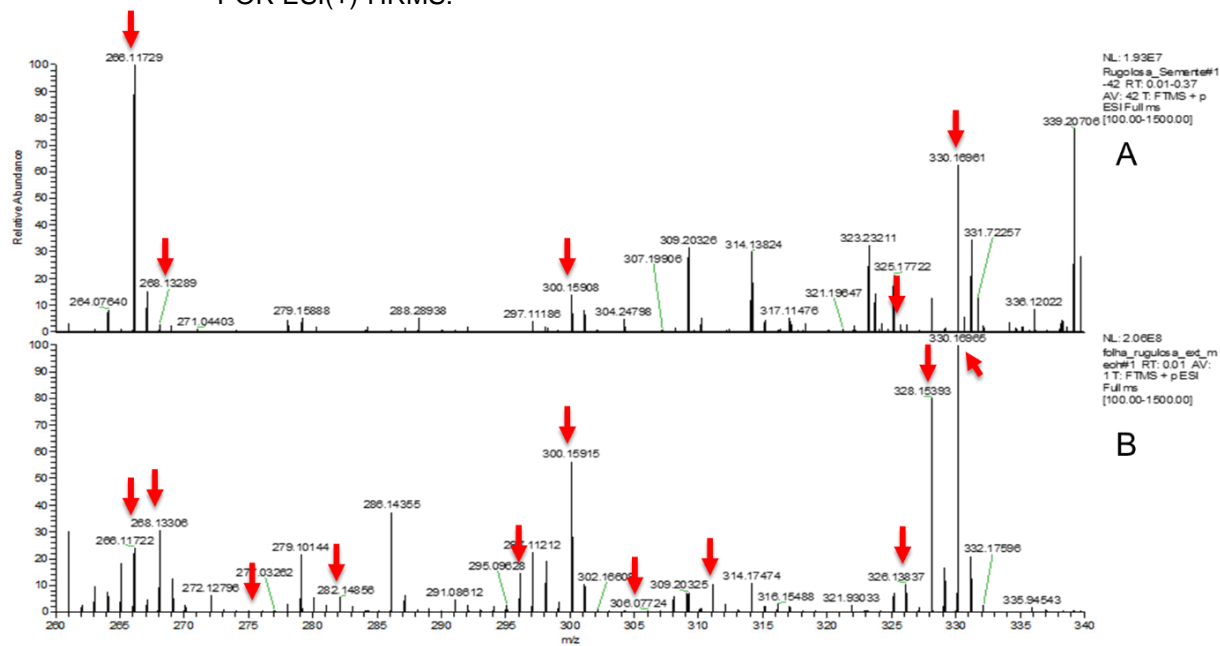
ESPECTRO 2 - FULLSCAN DO EXTRATO EM MEOH DAS SEMENTES DE *A. rugulosa* POR ESI(+)-HRMS.

Rugulosa_Semente #1-42 RT: 0.01-0.37 AV: 42 NL: 6.46E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]



FONTE: O autor (2016).

ESPECTRO 3 - COMPARAÇÃO DA REGIÃO DE IONS DE M/Z 260 A 340 DA DOS ESPECTROS DOS EXTRATOS EM MEOH DAS SEMENTES(A) E FOLHAS(B) DE *A. rugulosa* POR ESI(+)-HRMS.



FONTE: O autor (2016).

Na TABELA 5 abaixo estão descritas as massas e fórmulas moleculares, assim como os íons moleculares $[M+H]^+$ dos alcaloides. As fórmulas moleculares foram deduzidas através do software de processamento Xcalibur™ 3.0.63 e os erros dos defeitos de massas encontrados foram < 5 ppm. Além disso, foram realizados experimentos de fragmentação dos íons moleculares através da célula de colisão HCD, e os íons fragmentos gerados foram comparados com dados da literatura, confirmando suas identidades moleculares (SILVA et al., 2012).

TABELA 5 - ALCALOIDES IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS EM MEOH DAS FOLHAS E SEMENTES DE *Annona rugulosa*.

(continua)

| Alcaloides identificados | Massa molecular | Fórmula molecular | $[M+H]^+$ | Erro ppm |
|--------------------------|-----------------|--|-----------|----------|
| Anonaina* | 265,10973 | C ₁₇ H ₁₅ O ₂ N | 266,11751 | -0,170 |
| Asimilobina* | 267,12538 | C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N | 268,13313 | -0,281 |
| Liriodenina | 275,05769 | C ₁₇ H ₉ O ₃ N | 276,06519 | -1,194 |
| N-nornuciferina | 281,14103 | C ₁₈ H ₁₉ O ₂ N | 282,14858 | -0,976 |
| Xilopina | 295,12029 | C ₁₈ H ₁₇ O ₃ N | 296,12799 | -0,439 |

TABELA 5 - ALCALOIDES IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS EM MEOH DAS FOLHAS E SEMENTES DE *Annona rugulosa*.

| Alcaloides identificados | Massa molecular | Fórmula molecular | [M+H] ⁺ | (conclusão) Erro ppm |
|--|--------------------|--|--------------------|----------------------------|
| | | | | |
| Magnococlina/ <i>N</i> -metilcocclaurina* | 299,15160 | C ₁₈ H ₂₁ O ₃ N | 300,15935 | -0,233 |
| Nornantenina | 325,13086 | C ₁₉ H ₁₉ O ₄ N | 326,13860 | -0,259 |
| Norisocoridina/ Isoboldina* | 327,14651 | C ₁₉ H ₂₁ O ₄ N | 328,15401 | -0,989 |
| Reticulina* | 329,16216 | C ₁₉ H ₂₃ O ₄ N | 330,16977 | -0,650 |

FONTE: O autor (2016).

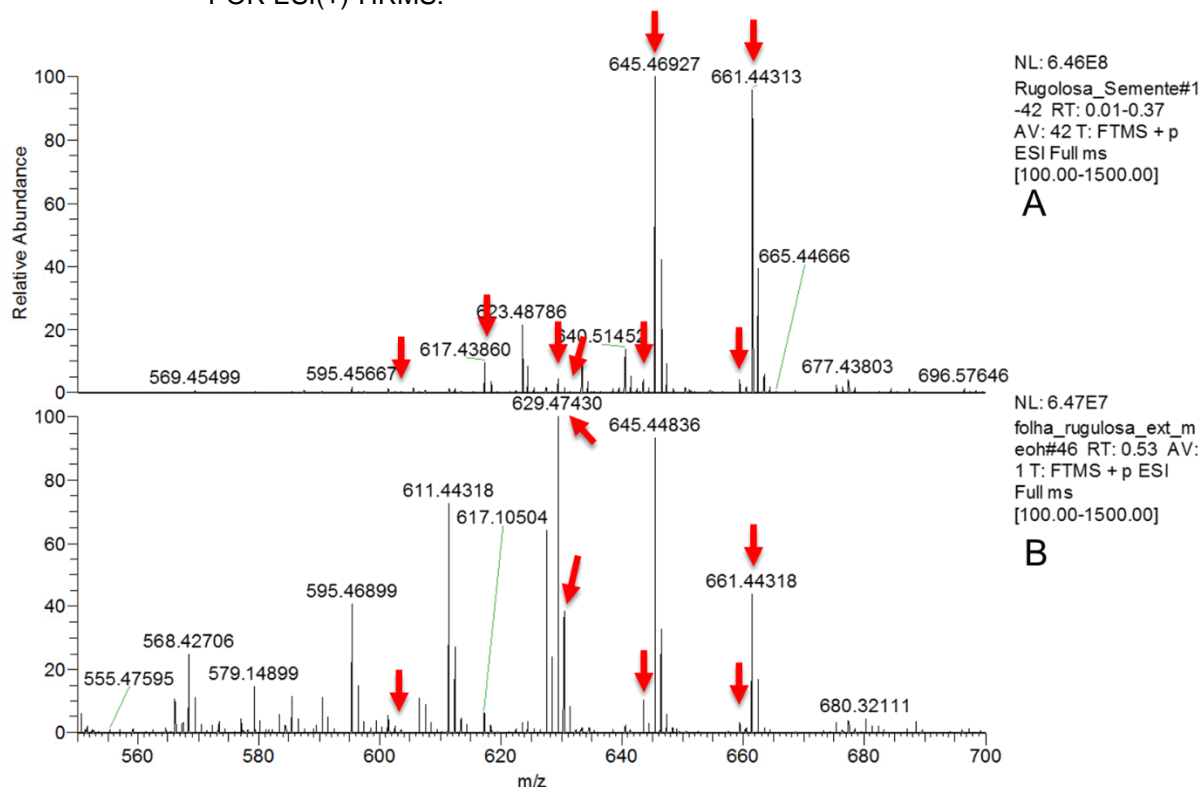
LEGENDA: * alcaloides encontrados nas sementes.

Nesta espécie, foram encontrados quatro isômeros de alcaloides, magnococlina, *N*-metilcocclaurina, norisocoridina e isoboldina, sendo necessário uma separação prévia para identificação destes. Embora esta seja uma limitação deste método, a análise foi realizada em extrato bruto e pode identificar com exatidão outros nove alcaloides com um tempo bem menor comparado ao tempo de análise convencional de extração e isolamento e posterior identificação por métodos espectrométricos, isto demonstra a capacidade *highthroughput* deste tipo de técnica.

Em ambos os espectros *fullscan* (ESPECTRO 1 e ESPECTRO 2) foi possível visualizar uma região com massas médias de íons de *m/z* 550 a 700 Da. Nesta região são encontradas as acetogeninas.

Ampliando a região de íons dos espectros de *fullscan* de *m/z* 550 a 700 Da das folhas (ESPECTRO 4 - B), foi possível observar seis íons protonados [M+H]⁺ de acetogeninas, já no espectro de massas do extrato MeOH das sementes (ESPECTRO 4 - A) foram observados oito íons protonados [M+H]⁺ de acetogeninas. Os dados dos espectros de massas do extrato MeOH das sementes e das folhas foram explanados na TABELA 6. A partir dos defeitos de massas dos íons é possível identificar as acetogeninas com erro < 5 ppm.

ESPECTRO 4 - COMPARAÇÃO DA REGIÃO DE IONS DE M/Z 550 A 700 DA DOS ESPECTROS DOS EXTRATOS EM MEOH DE SEMENTE (A) E FOLHAS (B) DE A. RUGULOSA POR ESI(+)-HRMS.



FONTE: O autor (2016).

Na TABELA 6 abaixo estão descritas as massas e as fórmulas moleculares, assim como os íons sodiados $[M+Na]^+$ das acetogeninas. As fórmulas moleculares foram deduzidas através do software de processamento Xcalibur™ 3.0.63. Além disso, foram realizados experimentos de fragmentação dos íons através da célula de colisão HCD. A ACG6 foi encontrada no extrato da semente na sua forma protonada, e no extrato da folha na forma de aduto de sódio.

Por ser uma análise exploratória a identificação das acetogeninas foi parcial, comprovando somente a classe dos metabólitos, sendo necessário a aplicação de outras técnicas para a determinação da identificação exata destas substâncias, uma vez que estas apresentam muitos isômeros para a mesma fórmula molecular.

TABELA 6 - ACETOGENINAS ENCONTRADAS NO EXTRATO EM MEOH DAS FOLHAS DE *A. rugulosa*.

| Id. | Massa molecular | Fórmula molecular | [M+Na] ⁺ | Erro ppm |
|-------|-----------------|--|---------------------|----------|
| ACG1 | 578,45409 | C ₃₅ H ₆₂ O ₆ | 601,44302 | -1,398 |
| ACG2 | 610,44392 | C ₃₅ H ₆₂ O ₈ | 633,43159 | -3,315 |
| ACG3 | 636,45957 | C ₃₇ H ₆₄ O ₈ | 659,44732 | -3,063 |
| ACG4 | 620,46466 | C ₃₇ H ₆₄ O ₇ | 643,45501 | 0,909 |
| ACG5 | 606,48539 | C ₃₇ H ₆₆ O ₆ | 629,47361 | 2,464 |
| ACG6* | 638,47522 | C ₃₇ H ₆₆ O ₈ | 661,46711 | 3,205 |
| ACG7† | 622.48031 | C ₃₇ H ₆₆ O ₇ | 645,46927 | -1,248 |
| ACG8† | 594.44901 | C ₃₅ H ₆₂ O ₇ | 617.43860 | -0.284 |

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: * a ACG6 aparece somente na sua forma protonada [M+H]⁺ na semente; † – íons observados somente no extrato das sementes.

Para a identificação das acetogeninas, foram utilizadas as fórmulas moleculares que apresentaram menor erro de defeito de massas. As fórmulas moleculares selecionadas foram utilizadas como parâmetro de pesquisa nas bases de dados Reaxys® e Scifinder®. A partir de cada fórmula molecular, foram encontradas de 30 a 40 possíveis acetogeninas. No entanto, com a interpretação dos espectros de fragmentações foi possível reduzir todas essas possibilidades. As possíveis identificações das acetogeninas estão representadas na TABELA 7.

Esta é a primeira vez que está sendo relatada na literatura a identificação de acetogeninas em *A. rugulosa*. Neste sentido, o isolamento e a identificação destas são necessárias, uma vez que estas possuem um amplo espectro de atividades biológicas.

TABELA 7 – POSSÍVEIS ACETOGENINAS ENCONTRADAS NOS EXTRATOS EM MEOH DAS FOLHAS E SEMENTES DE *A. rugulosa*.

| Id. | Acetogeninas |
|------|---|
| ACG1 | Corossolona; neoannin; squamocin I, J, K; annosquacin A |
| ACG2 | Montanocin B, C, G; parvifloracin; annontamin B, C; annomolon B |
| ACG3 | Goniotriocin I |
| ACG4 | Goniocin |
| ACG5 | Rollidecin D, Asiminemin A, B |
| ACG6 | Cherimoline; bullatanocin; cherimolin 1, 2; uleicin A, B, C, D, E; purpureacin; mulocin, squamostatin A, B, C, D; gigantecin; sylvaticin; bullatalicin; annoglaucin; rollitacin; araticulin; bulladecin; rollidecin B; asimitrin; annosquatin I, II |
| ACG7 | Annonine VI; asimicin; bullatacin; rolliniastatin 1, 2; jimenezin; gonionenin; squamosten A; epomusenin A, B; annogalene; glabronin; glaucaflorin, trilobacin |
| ACG8 | Annonacinone; parviflorin; molvirazin; longimicin B, C; muricin F, G; reticulacinone; rollinacin; annoncherin; annomolon A; anmontanin A |

FONTE: O autor (2016).

A quantidade relativa de alcaloides e acetogeninas foi realizada com base na intensidade iônica observada nos espectros dos extratos em MEOH das folhas e sementes. Comparando a região dos íons de m/z 260 a 340 Da referente aos alcaloides e a região dos íons de m/z 550 a 700 Da referente às acetogeninas, no extrato das folhas, é possível sugerir que os alcaloides estão em maior proporção do que as acetogeninas. Já no extrato das sementes, ocorre uma inversão, sendo observada uma proporção menor de alcaloides do que de acetogeninas.

Na região de íons de m/z 800 a 940 Da foi observada a presença de lipídios e graxas, entretanto estas substâncias por não fazerem parte do escopo deste trabalho não foram investigadas.

A partir da identificação dos íons de alcaloides e acetogeninas, foram realizadas as imagens das distribuições moleculares nos tecidos vegetais.

5.3.1.1 Identificação dos alcaloides por Espectrometria de Massas Sequencial

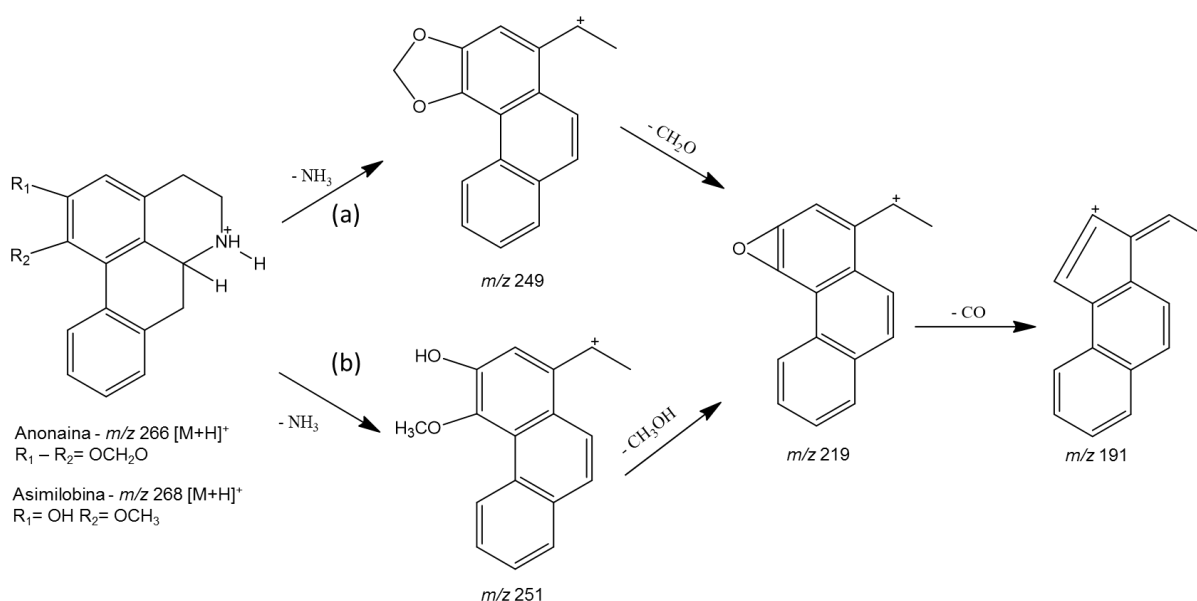
Nas análises do extrato em MeOH de folhas e sementes foi possível observar a presença de onze íons de alcaloides, dos quais sete são aporfínicos, dois oxaporfínicos e dois benziltetrahydroisoquinólicos. As fragmentações destes por HCD estão sendo relatada pela primeira vez. Os íons fragmentos obtidos foram comparados com íons obtidos via CID (SILVA et al., 2012).

Abaixo estão descritos os principais fragmentos e os prováveis mecanismos de fragmentação dos alcaloides.

a) Anonaina (ANEXO 1): m/z 266,11751 $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{15}O_2N$). A partir da fragmentação do íon da anonaina foi possível observar os íons fragmentos m/z 249 $[M-NH_3]^+$, m/z 219 $[249-CH_2O]^+$, m/z 191 $[219-CO]^+$, conforme o mecanismo sugerido na FIGURA 14, perdas neutras comuns em alcaloides aporfínicos, já relatadas na literatura (SILVA et al., 2012).

b) Assimilobina (ANEXO 2): m/z 268,13313 $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{17}O_2N$). A partir da fragmentação do íon da assimilobina foi possível observar os íons fragmentos m/z 251 $[M-NH_3]^+$, m/z 236 $[251-CH_3]^+$, m/z 219 $[251-CH_2O]^+$ e m/z 191 $[219-CO]^+$, conforme o mecanismo sugerido na FIGURA 14, perdas neutras comuns em alcaloides aporfínicos, já relatadas na literatura (SILVA et al., 2012).

FIGURA 14 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA ANONAINA (A) E ASSIMIOLOBINA (B).

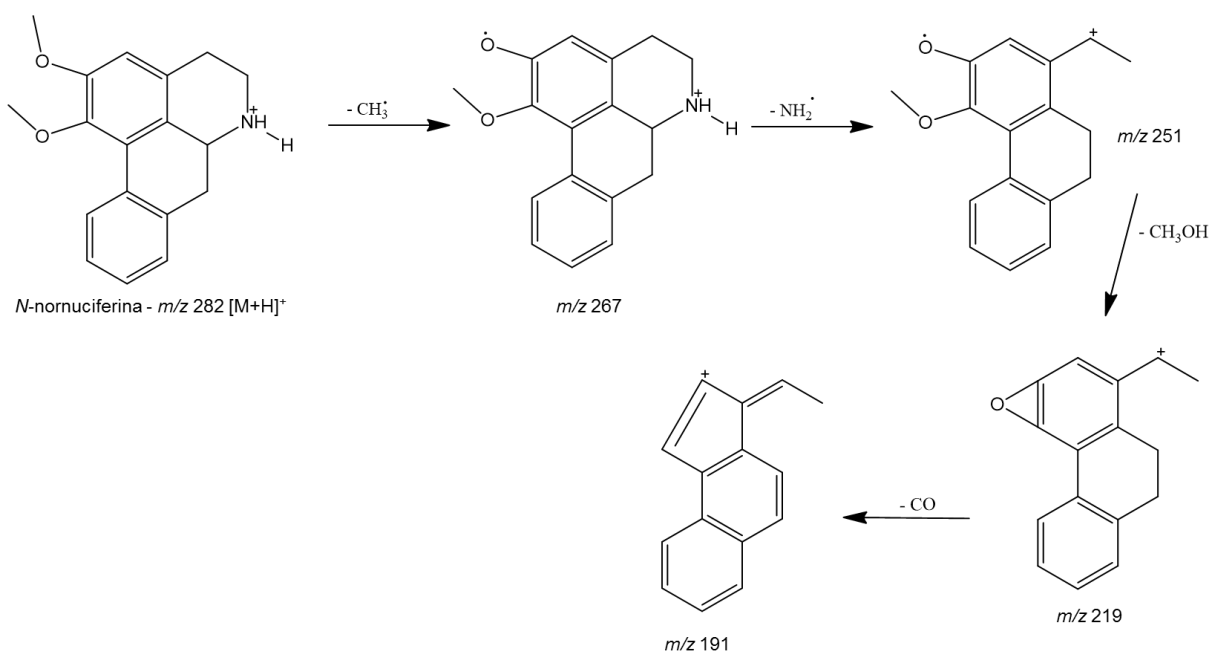


FONTE: Adaptada de SILVA (2012)

c) *N*-nornuciferina (ANEXO 3): m/z 282,14858 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{19}O_2N$). A partir da fragmentação do íon da *N*-nornuciferina foi possível observar os íons fragmentos m/z 267 $[M-CH_3]^+$; m/z 251 $[M-CH_3OH]^+$, m/z 219 $[251-CH_3OH]^+$ e o m/z 191 $[219-CO]^+$, conforme o mecanismo sugerido na FIGURA 15, perdas neutras comuns em alcaloides aporfínicos, já relatadas na literatura (SILVA et al., 2012).

d) Liriodenina: m/z 276,06519 $[M+H]^+$ ($C_{17}H_9O_3N$). Não foi possível realizar a fragmentação devido à baixa intensidade iônica, sendo confirmado a fórmula molecular através do defeito de massas com erro de 1,194 ppm < 5 ppm.

FIGURA 15 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA *N*-NORNUCIFERINA

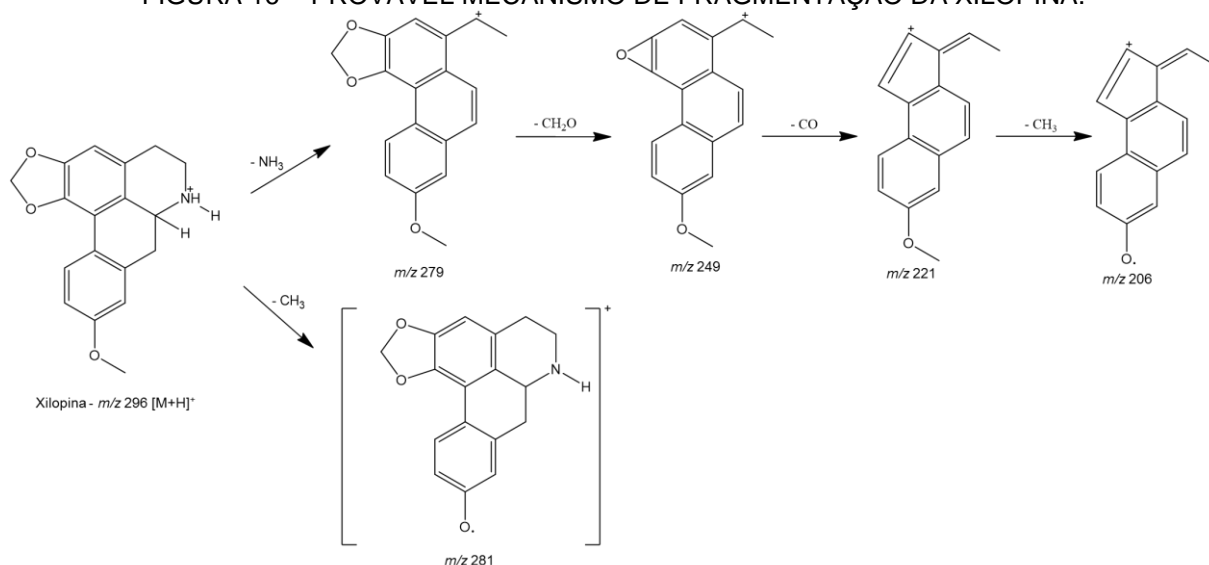


FONTE: Adaptada de SILVA (2012)

e) Lanuginosina: m/z 306,07652 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{11}O_4N$). Não foi possível realizar a fragmentação devido à baixa intensidade iônica, sendo confirmado a fórmula molecular através do defeito de massas com erro de 1,423 ppm < 5 ppm.

f) Xilopina (ANEXO 5): m/z 296,12799 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{17}O_3N$). A partir da fragmentação do íon da xilopina (FIGURA 16) foi possível observar os íons fragmentos m/z 281 $[M-CH_3]^+$; m/z 249 $[281-CH_3OH]^+$, m/z 221 $[249-CO]^+$, m/z 206 $[221-CH_3]^+$ perdas neutras comuns em alcaloides aporfínicos, já relatadas na literatura.

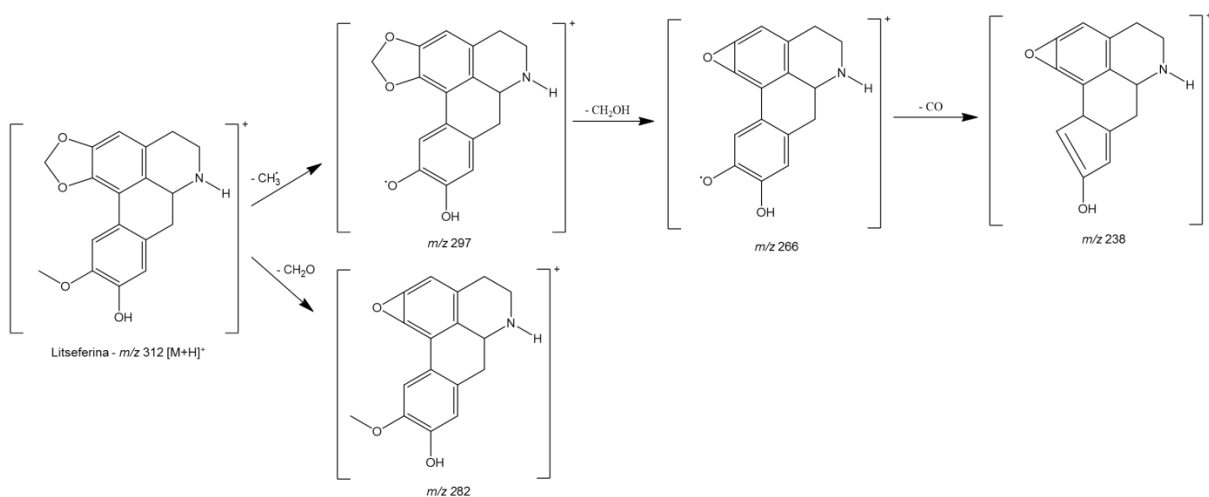
FIGURA 16 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA XILOPINA.



FONTE: Adaptada de SILVA (2012)

g) Litseferina (ANEXO 6): m/z 312,12313 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{17}O_4N$). A partir da fragmentação do íon da litserina (FIGURA 17) foi possível observar os íons fragmentos m/z 297 $[M-CH_3]^+$; m/z 266 $[297-CH_3O]^+$, m/z 238 $[266-CO]^+$, m/z 282 $[M-CH_2O]^+$, m/z 254 $[282-CO]$ perdas neutras comuns em alcaloides aporfínicos, já relatadas na literatura.

FIGURA 17 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA LITSEFERINA.

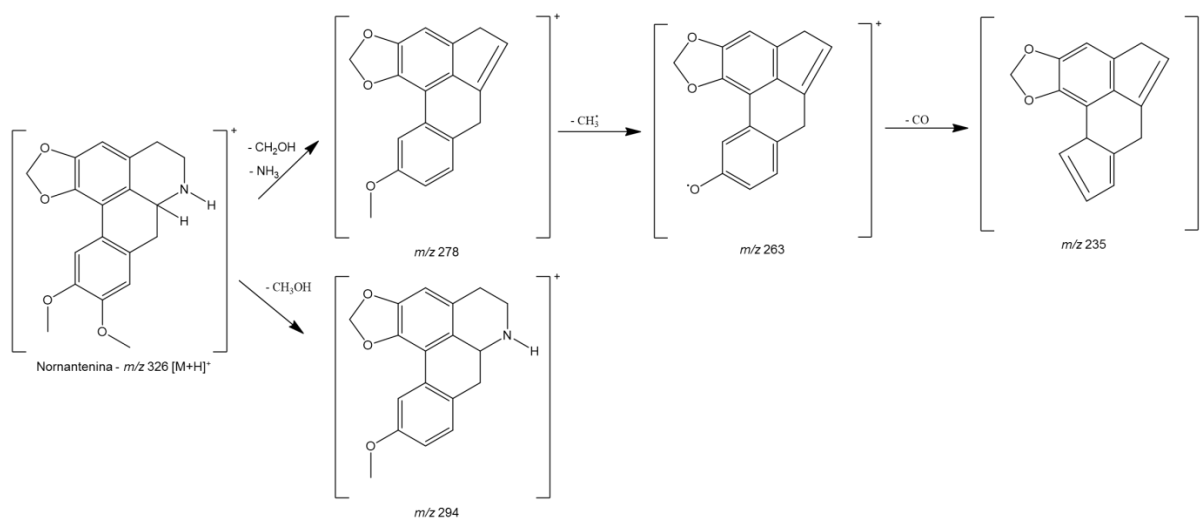


FONTE: Adaptada de SILVA (2012)

h) Nornantenina (ANEXO 7): m/z 326,13860 $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{15}O_2N$). A partir da fragmentação do íon da nornantenina (FIGURA 18) foi possível observar os íons

fragmentos m/z 294 $[M-CH_3OH]^+$; m/z 278 $[M-NH_3-CH_2OH]^+$, m/z 263 $[278-CH_3]^+$, m/z 235 $[263-CO]^+$ perdas neutras comuns em alcaloides aporfínicos.

FIGURA 18 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA NORNANTENINA.

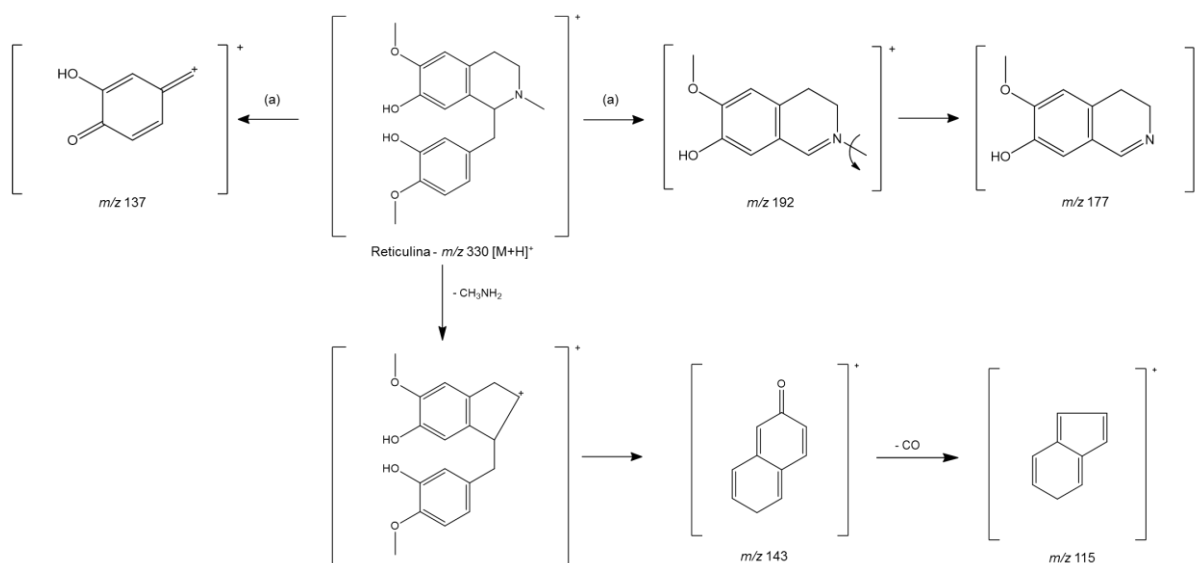


FONTE: Adaptada de SILVA (2012)

i) Norisocoridina/isoboldina (ANEXO 8): m/z 328,15401 $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{21}O_4N$). A partir da fragmentação do íon m/z 328 $[M+H]^+$ foi possível observar vários fragmentos, entre eles fragmentos de perdas neutras dos grupamentos metoxilas já descritos na literatura como pertencentes a isoboldina m/z 297 $[M-CH_2OH]^+$; m/z 265 $[297-CH_3OH]^+$ m/z 250 $[265-CH_3]^+$ e o íon m/z 237 $[265-CO]^+$, foram encontrados o mesmo padrão de fragmentação para a norisocoridina, exceto pelo íon m/z 250 $[265-CH_3]^+$ relativo a perda da metila do nitrogênio (CHEN et al., 1999; LI et al., 2015).

j) Reticulina (ANEXO 9): m/z 330,16977 $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{23}O_4N$). A partir da fragmentação do íon da reticulina (FIGURA 19), alcaloide da classe dos benziltetrahidroisoquinolínicos, foram observados os íons fragmentos m/z 192 $[M-H]^+$ e 137 $[M+H]$, estes íons se formam pela quebra induzida da porção do aminoácido tiramina da molécula (FIGURA 16 - a), além deles é possível observar os íons m/z 177 $[192-CH_3]^+$ relativo a perda da metila (JEONG et al., 2012).

FIGURA 19 - PROVÁVEL MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO DA RETICULINA.



FONTE: Adaptada de JEONG (2012)

k) Magnococlina/*N*-metilcocclaurina (ANEXO 10): m/z 300,16977 $[M+H]^+$ ($C_{19}H_{23}O_4N$). A partir da fragmentação do íon m/z 300,16977 $[M+H]^+$ não é possível diferenciar os isômeros magnococlina e *N*-metilcocclaurina através da infusão direta, por possuírem a mesma fórmula molecular, podendo apresentar o mesmo perfil de fragmentação. Foram observados os íons fragmentos m/z 175 $[M-C_7H_7O-H_2O]^+$ e m/z 107 $[M-C_{11}H_{11}O_2]^+$, que se formam pela quebra induzida da porção do aminoácido tiramina (FIGURA 19), estes são produtos dos rearranjos comuns em alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos. (JEONG et al., 2012; SCHMIDT et al., 2005).

5.3.1.2 Identificação de acetogeninas por Espectrometria de Massas Sequencial

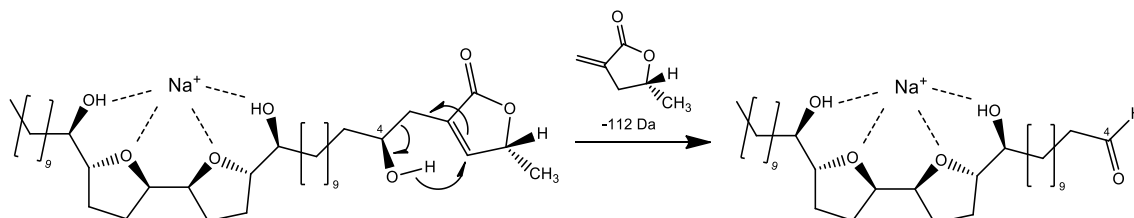
No total foram detectadas as presenças de oito acetogeninas (TABELA 6 e TABELA 7), através das análises por ESI-HRMS dos extratos em MeOH das folhas e sementes. Foram realizados experimentos de fragmentação das moléculas utilizando o método de fragmentação por HCD, foi possível observar íons fragmentos comuns em acetogeninas, como as perdas neutras de água, monóxido e dióxido de carbono e da γ -lactona terminal, que é comum em acetogeninas que possuem uma hidroxila no carbono 4 (LE VEN et al., 2014). Abaixo encontram-se as

acetogeninas encontradas nos extratos de metanol das folhas e sementes de *A. rugulosa*.

a) ACG1 (ANEXO 11): m/z 601,44352 $[M+Na]^+$ ($C_{35}H_{62}O_6Na$). A partir do experimento de fragmentação do íon sodiado de ACG1 foi possível observar os íons fragmentos de m/z 573 $[M-CO]^+$; m/z 557 $[M-CO_2]^+$, perdas neutras comuns em acetogeninas, sugerindo a presença de um grupo éster e/ou cetona na cadeia ou proveniente da γ -lactona. Não foram observadas perdas neutras de H_2O (18 Da 36 Da) relativas a presença de grupos hidroxilas na cadeia. Os espectros de massas relativos as fragmentações estão em anexo.

Foram observados fragmentos com perda neutra de 112 Da nas ACG2, ACG3, ACG4, ACG5, ACG6, ACG7, ACG8. Acetogeninas que apresentam estes fragmentos geralmente possuem em sua estrutura uma hidroxila no carbono 4, sendo considerado um íon diagnóstico. Essa perda neutra é referente ao rearranjo da γ -lactona terminal com o hidrogênio da hidroxila ligado ao carbono 4, este mecanismo pode ser observado na FIGURA 20 (GU et al., 1999).

FIGURA 20 - REARRANJO MOLECULAR REFERENTE A PERDA NEUTRA DE 112 DA.



FONTE: adaptada de GU (1999)

b) ACG2 (ANEXO 12): m/z 633,43373 $[M+Na]^+$ ($C_{35}H_{62}O_8Na$). A fragmentação mostrou íons de m/z 521 $[M-LAC]^+$ relativo a perda neutra da γ -lactona (FIGURA 20), íon de m/z 485 $[M-LAC-2H_2O]^+$ sugerindo a presença hidroxilas na cadeia. Além disso, houve outra perda neutra de 28 Da relativo a saída de monóxido de carbono, representada pelo íon de m/z 457 $[M-LAC-2H_2O-CO]^+$ sugerindo a presença de um grupo funcional cetona e/ou éster. A partir destas informações o indicio de que esta molécula é uma acetogenina que possui uma hidroxila no carbono 4 e outras hidroxilas distribuída na cadeia carbônica é evidente.

c) ACG3 (ANEXO 13): m/z 659,44857 $[M+Na]^+$ ($C_{37}H_{64}O_8Na$). A fragmentação mostrou a presença de hidroxilas, devido ao surgimento dos íons fragmentos de m/z 641 $[M-H_2O]^+$ e m/z 547 $[M-LAC]^+$, sendo que uma está

localizada no carbono 4 indicada pela perda neutra de 112 Da (LAC). A presença dos íons fragmentos de m/z 613 $[M-H_2O-CO]^+$ e 599 $[M-H_2O-CH_2C=O]$ sugerem a presença de grupos funcionais cetona e/ou éster.

d) ACG4 (ANEXO 14): m/z 643,45413 $[M+Na]^+$ ($C_{37}H_{64}O_7Na$). A fragmentação mostrou a presença de hidroxilas pelos íons fragmentos de m/z 625 $[M-H_2O]^+$ e m/z 531 $[M-LAC]^+$; sendo que uma está localizada no carbono 4 indicada pelo íon pela perda neutra de 112 Da (LAC). A presença dos íons fragmentos m/z 615 $[M-CO]^+$ e m/z 599 $[M-CO_2]^+$ sugerem a presença de grupos funcionais cetona e/ou éster.

e) ACG5 (ANEXO 15): m/z 629,47500 $[M+Na]^+$ ($C_{37}H_{66}O_6Na$). A fragmentação mostrou a presença de hidroxilas pelos íons fragmento de m/z 611 $[M-H_2O]^+$ e m/z 517 $[M-LAC]^+$, sendo que uma está localizada no carbono 4 indicada pelo íon pela perda neutra de 112 Da (LAC). A presença dos íons fragmentos m/z 601 $[M-CO]^+$ e m/z 585 $[M-CO_2]^+$, sugerem a presença de grupos cetona e/ou éster.

f) ACG6 (ANEXO 16): m/z 639,48393 $[M+H]^+$ ($C_{37}H_{66}O_8$). Não foi possível obter a fragmentação deste íon pela baixa intensidade iônica, sendo comprovada a fórmula molecular através do defeito de massas de 1,383 ppm.

g) ACG7 (ANEXO 17): m/z 645,46927 $[M+Na]^+$ ($C_{37}H_{66}O_7Na$). A fragmentação mostrou a presença de hidroxilas pelos íons fragmentos de m/z 627 $[M-H_2O]^+$ e m/z 533 $[M-LAC]^+$ sendo que uma está localizada no carbono 4 indicada pelo íon pela perda neutra de 112 Da (LAC). A presença dos íons fragmentos m/z 617 $[M-CO]^+$ e m/z 601 $[M-CO_2]^+$, sugerem a presença de cetona e/ou éster.

h) ACG8 (ANEXO 18): m/z 617.43860 $[M+Na]^+$ ($C_{35}H_{62}O_7Na$). A fragmentação mostrou a presença de hidroxilas pelos íons fragmentos de m/z 571 $[M-CO_2-H_2O]^+$ e m/z 505 $[M-LAC]^+$ sendo que uma está localizada no carbono 4 indicada pelo íon pela perda neutra de 112 Da (LAC). As perdas neutras de monóxido m/z 589 $[M-CO]^+$ e dióxido de carbono m/z 571 $[M-CO_2-H_2O]^+$ sugerem a presença de cetona e/ou éster.

Devido à falta de dados na literatura sobre a fragmentação por HCD de acetogeninas e poucos dados de RMN para comparação, foi possível somente confirmar as moléculas como pertencentes a classe de acetogeninas.

5.3.2 Análise por DESI direta da folha

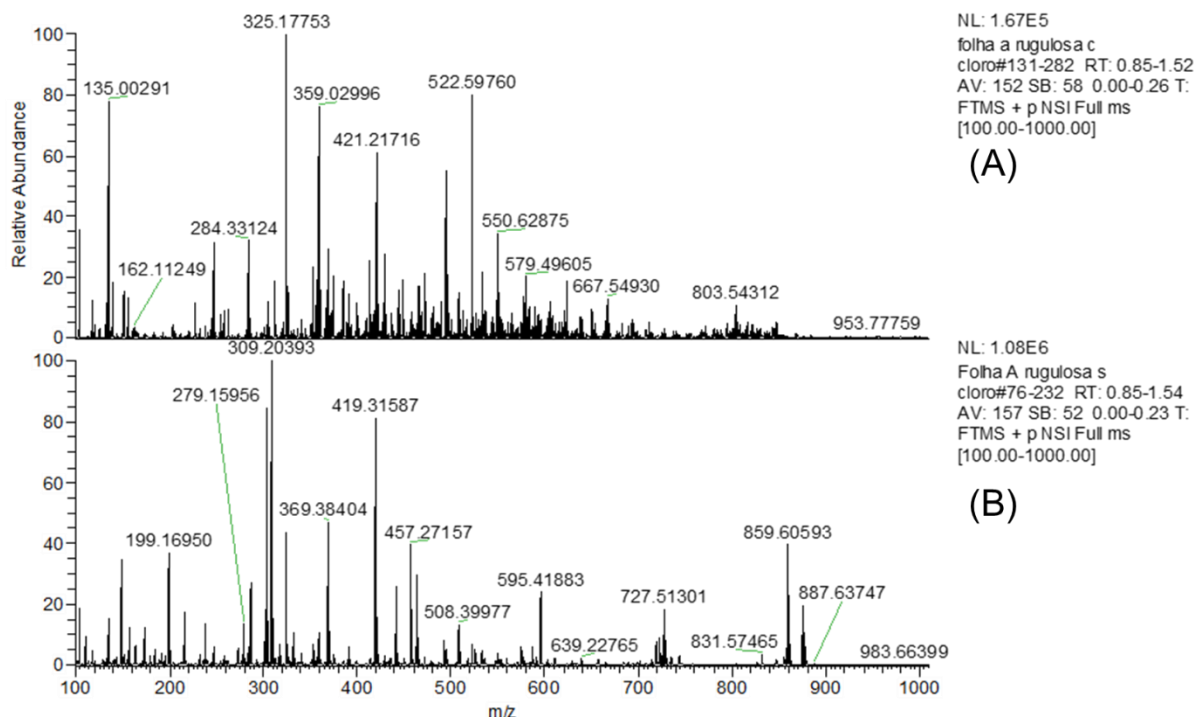
5.3.2.1 Pré-tratamento das folhas

Após a identificação das acetogeninas e alcaloides nos extratos, foram realizados testes com a fonte DESI para a identificação destes metabólitos diretamente nos tecidos vegetais.

Na literatura são relatados a utilização de pré-tratamentos da superfície da amostra com diversos tipos de solventes antes da obtenção dos espectros de massas, levando em conta sempre o tipo de amostra que irá ser analisada, sendo que nem sempre são observados resultados positivos, podendo interferir em muitos casos (CABRAL et al., 2013; LI et al., 2011, 2013). Neste sentido, antes do início dos testes com a fonte DESI as amostras foram prensadas com o objetivo de deixar a superfície da amostra regular para o escaneamento.

Avaliando os espectros de massas de *fullscan* obtidos por DESI-MS (ESPECTRO 5) diretamente da folha, é possível observar que a metade da folha onde a superfície foi tratada com clorofórmio (A), há um espectro de massas com uma relação sinal/ruído muito baixa além de uma intensidade iônica menor quando comparado a análise da outra metade da folha sem pré-tratamento com clorofórmio (B). Além disso, muitos sinais que apareceram no lado sem tratamento (B) não são observados no lado da folha com tratamento (A), sugerindo que os analitos responsáveis por esses sinais podem ter sido removidos, assim como a camada cerosa da cutícula pelo clorofórmio.

ESPECTRO 5 - FOLHA COM PRÉ-TRATAMENTO COM CLOROFÓRMIO (A); FOLHA SEM PRÉ-TRATAMENTO (B) POR DESI(+)-MS.



FONTE: O autor (2016)

Devido a isso não foi utilizado o pré-tratamento com clorofórmio nas amostras, já que a utilização deste solvente pode ser prejudicial para a aquisição das imagens, utilizando as amostras no estado *in natura*.

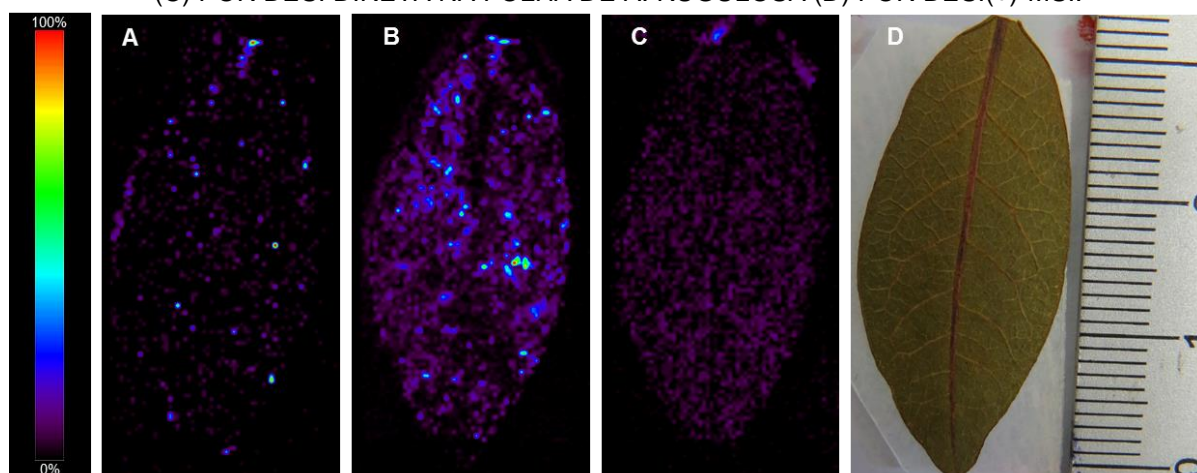
5.3.2.2 Mapeamento dos íons por DESI-MSI das folhas

Após a otimização dos parâmetros da DESI-MSI, e do preparo de amostra, foram obtidas as imagens através da distribuição dos íons dos alcaloides e acetogeninas a partir da epiderme superior da folha sem pré-tratamento com clorofórmio. A identificação dos alcaloides e das acetogeninas diretamente nas folhas, foi realizada através do erro do defeito de massas. Devido à baixa intensidade iônica dos metabólitos na folha, não foi possível realizar os experimentos de fragmentação através da fonte DESI.

Na FIGURA 21, é possível observar a presença dos alcaloides anonaina (A), reticulina (B) e liriodenina (C) considerados marcadores da família Annonaceae, assim como sua distribuição na superfície da folha. A cor vermelha representa a maior intensidade iônica do íon na imagem, e a cor preta representa a ausência do

ion naquela região. No caso da anonaina, é possível visualizar duas regiões vermelhas na imagem (FIGURA 21 - A), nestas regiões é onde são encontradas a maior concentração da anonaina na folha. A intensidade iônica máxima obtida foi da ordem de 10^6 para os alcaloides, ou seja, nas regiões vermelhas que aparecem nas imagens da distribuição dos alcaloides, há uma população iônica de 10^6 . Já para os íons das acetogeninas a intensidade iônica máxima é de 10^5 nas regiões vermelhas.

FIGURA 21 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALCALOIDES ANONAINA (A), RETICULINA (B) E LIRIODENINA (C) POR DESI DIRETA NA FOLHA DE *A. RUGULOSA* (D) POR DESI(+)-MSI.



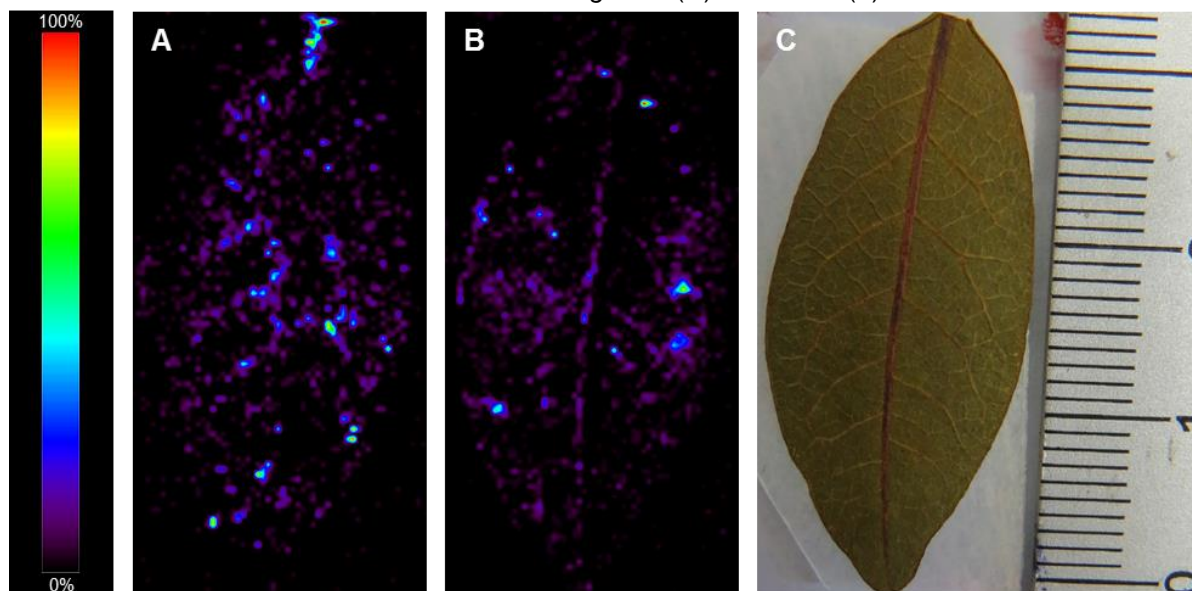
FONTE: O autor (2016).

Apesar de ser possível observar os sinais da liriodenina (FIGURA 21 – C) e da litsferina (ANEXO 18 - B) no extrato, a intensidade iônica nas MSIs destes alcaloides foi baixa, isto pode ter ocorrido pela baixa mobilidade molecular e pela época em que foram coletadas as folhas. Por se tratar de uma superfície sólida, as moléculas não possuem liberdade para se distribuírem por todo o tecido, ficando restritas aos seus locais de armazenamento. A intensidade iônica depende da concentração do analito na amostra sólida, que neste caso pode variar durante o ano devido a sazonalidade de produção da liriodenina e da litseferina. Mesmo assim, a DESI-MSI direta mostrou-se eficiente para a identificação e no detalhamento da distribuição espacial dos alcaloides, sendo que esta análise não pode ser obtida através da análise de extratos (CABRAL et al., 2013; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MÜLLER et al., 2011).

Na distribuição iônica (FIGURA 22), obtida dos alcaloides asimilobina (A) e norisocoridina (B), pode ser observado que estas moléculas estão distribuídas

próximas aos vasos condutores da folha (nervuras), este é um indicio de que estes alcaloides são distribuídos por toda a planta.

FIGURA 22 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALCALOIDES ASIMIOLOBINA (A) E NORISOCORIDINA (B) POR DESI DIRETA NA FOLHA DE *A. rugulosa* (C) POR DESI(+)-MSI.

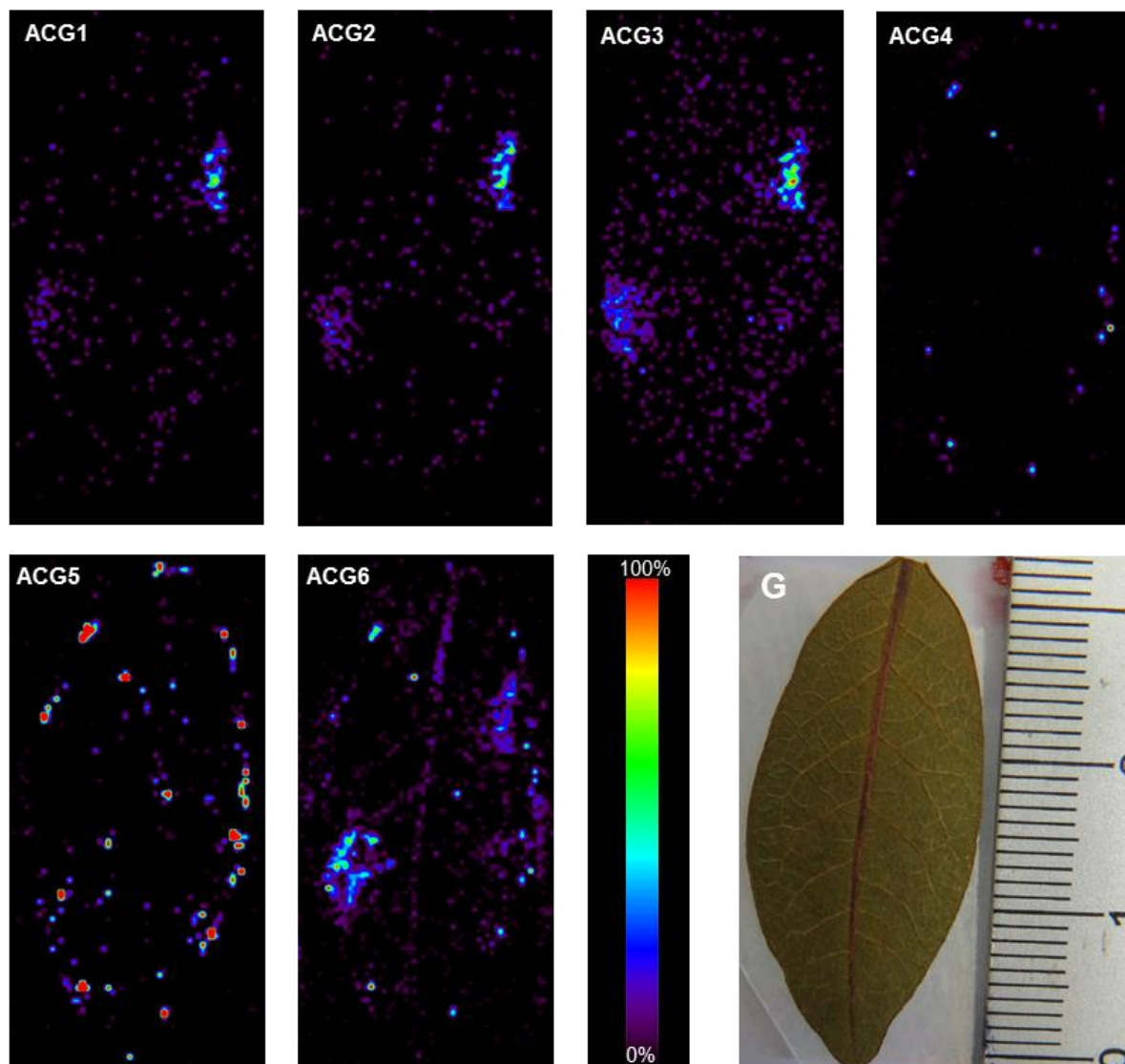


FONTE: O autor (2016).

Na folha também foi possível observar acetogeninas (FIGURA 23). A ACG5 foi a que apresentou maior intensidade da cor vermelha, quando comparada as outras acetogeninas, este é um indicio de que está acetogenina esteja em maior concentração. Nas imagens das ACG1, ACG2, ACG3 e ACG6 é possível observar duas regiões em comum, por se tratarem de moléculas com massas diferentes existe a possibilidade destas acetogeninas serem produtos da mesma rota de biossíntese, porém com mudanças nas suas cadeias ou até mesmo serem moléculas intermediárias, mas para confirmar esta hipótese seria necessário o cultivo desta espécie com isótopos de aminoácidos (LI et al., 2013).

Através da comparação das imagens dos alcaloides e das acetogeninas das folhas, é possível verificar que a presença dos alcaloides é muito mais abundante, tanto na concentração (maior área na cor vermelha) como na variedade. As acetogeninas foram encontradas em pontos específicos da folha, a ACG5 é a acetogenina com a maior intensidade iônica entre as acetogeninas com 10^5 (100%) como mostrado na FIGURA 23 abaixo.

FIGURA 23 - DISTRIBUIÇÃO DAS ACETOGENINAS ENCONTRADAS POR DESI DIRETA NA FOLHA DE *A. rugulosa* (G) POR DESI(+)-MSI.



FONTE: O autor (2016).

A partir da DESI direta foi possível mapear as acetogeninas e alcaloides diretamente da superfície da folha com mínimo preparo de amostra, corroborando com os resultados obtidos por ESI-HRMS dos extratos em MeOH das folhas, pois foram identificados os mesmos alcaloides e acetogeninas.

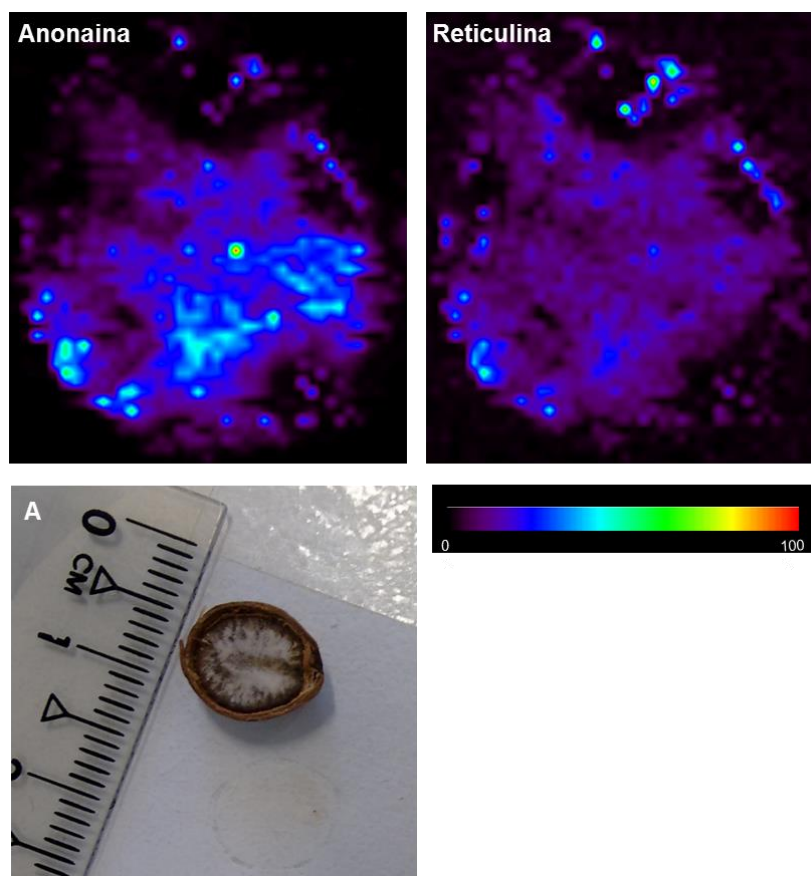
5.3.3 Análise por DESI indireta (*imprint*) da semente

A análise de DESI indireta é realizada em amostras que possuem a superfície com muitas irregularidades que podem desviar o sentido do spray da fonte ou amostras que não resistam à força do spray. Por isso, para realizar este tipo de análise é necessária uma superfície que seja capaz de fixar os analitos, sem que haja nenhuma alteração da composição química da superfície da amostra. As principais superfícies utilizadas para DESI indireta são as cromatofolhas de sílica e as membranas de PTFE, a escolha destas superfícies depende do tipo de amostra que está sendo analisada (CABRAL et al., 2013).

As sementes de *A. rugulosa* foram cortadas axialmente (FIGURA 24 - A), devido a rigidez da casca, irregularidade e fragilidade do endosperma foi necessário fazer um *imprint* da semente. Com base na literatura e ao fácil manuseio, a superfície escolhida foi a membrana de PTFE.

A intensidade iônica máxima para os alcaloides encontrados na semente foi da ordem de 10^3 (100% na barra de cor vermelha – FIGURA 24). Apesar de terem sido identificados cinco alcaloides no extrato das sementes, no *imprint* só foi possível mapear dois alcaloides. Os outros três estavam com uma intensidade iônica muito baixa, não sendo possível o mapeamento.

FIGURA 24 - IMAGENS DOS ALCALOIDES OBTIDAS POR DESI-MSI DO IMPRINT DA SEMENTE DE *A. rugulosa* (A) POR DESI(+)-MSI.

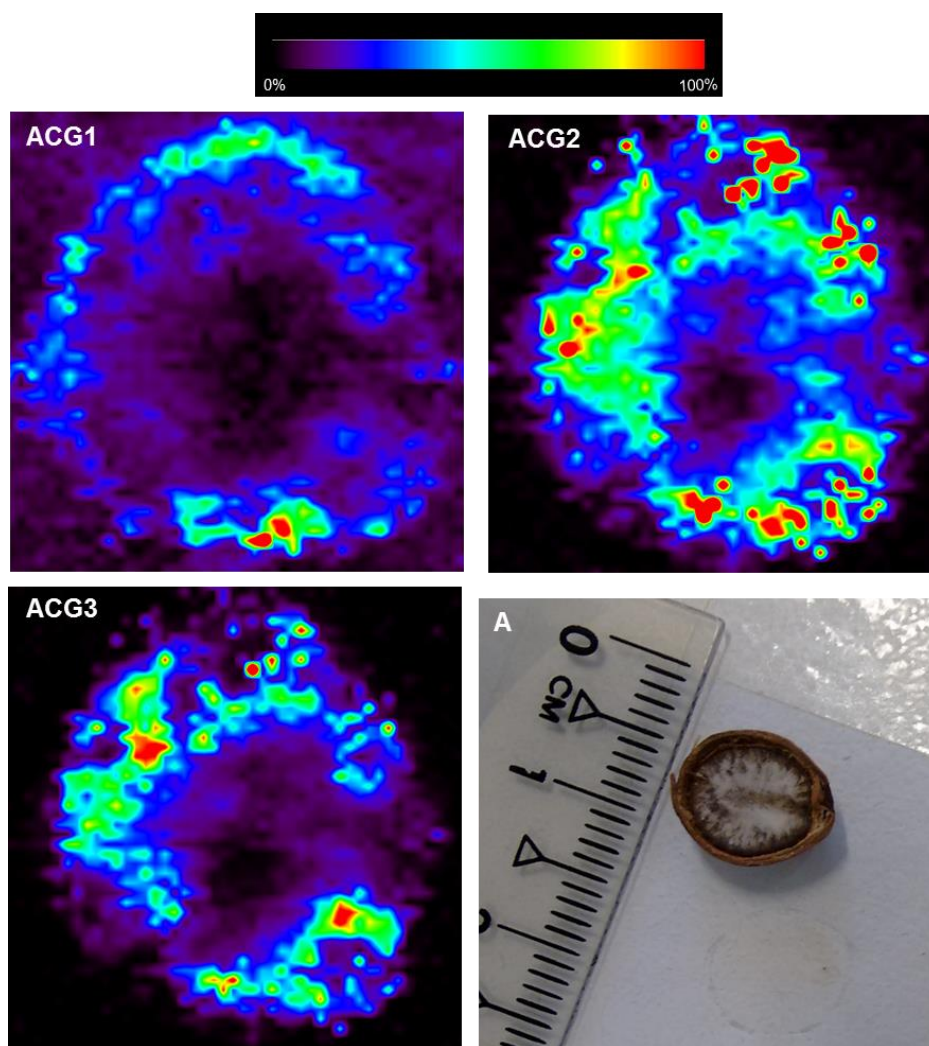


FONTE: O autor (2016).

Na DESI-MSI indireta da semente, foram observados os íons de m/z 266,11751 $[M+H]^+$ e m/z 330,16977 $[M+H]^+$ referente aos alcaloides anonaina e reticulina, respectivamente. Estes alcaloides foram também observados no extrato em MeOH das folhas e por DESI-MSI diretamente da folha. Os outros alcaloides identificados na folha não puderam ser observados nas imagens da semente, isto se deve ao fato de que na semente a concentração destes metabólitos é menor quando comparado com a folha.

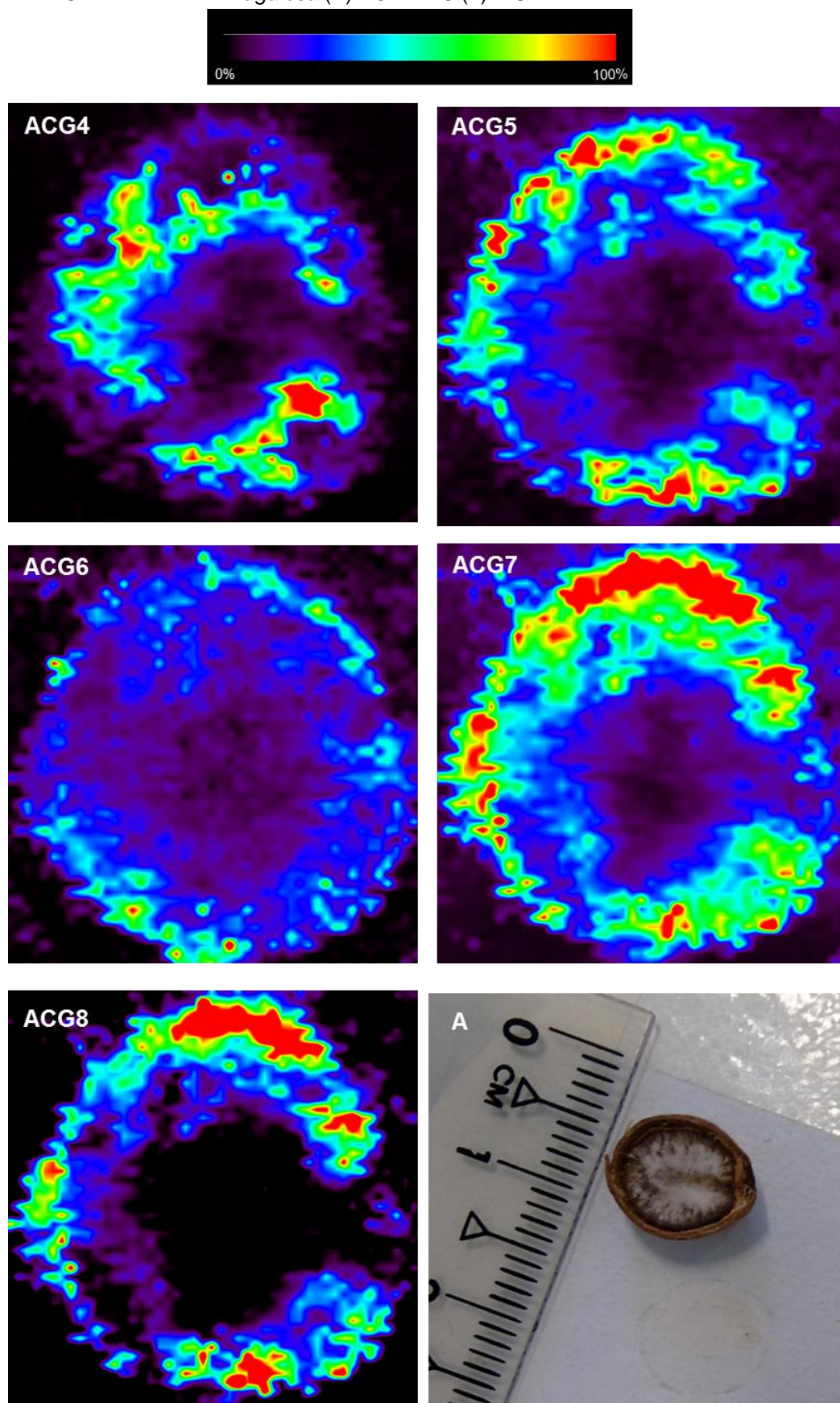
Já as acetogeninas puderam ser observadas (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** FIGURA 25) com uma intensidade iônica muito maior, da ordem de 10^7 . Este é um indicio que as acetogeninas estão presentes em maior quantidade nas sementes, estes dados também são fundamentados pela análise dos extratos por ESI(+)-HRMS.

FIGURA 25 – DISTRIBUIÇÃO DAS ACETOGENINAS OBTIDAS POR DESI-MSI DO IMPRINT DA SEMENTE DE *A. rugulosa* (A) POR DESI(+)-MSI.



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 26 - DISTRIBUIÇÃO DAS ACETOGENINAS OBTIDAS POR DESI-MSI DO IMPRINT DA SEMENTE DE *A. rugulosa* (A) POR DESI(+)-MSI.



FONTE: O autor (2016).

As acetogeninas estão distribuídas uniformemente na região mais externa do endosperma da semente em volta do embrião, sendo a ACG7 presente em maior quantidade, seguida da ACG8 (FIGURA 26). Esta análise semi-quantitativa se dá através da área da cor vermelha através das imagens, quanto maior a área vermelha na imagem maior será a intensidade iônica e a quantidade distribuída do analitos pela superfície da amostra. A alta intensidade iônica das acetogeninas pode ser um indicio que a planta as utiliza como uma defesa natural contra insetos e micro-organismos que possam interferir na continuidade da espécie, devido a suas atividades citotóxica e pesticida.

As imagens por DESI indireta apresentaram uma resolução de imagem e uma intensidade iônica maior do que as apresentadas por DESI direta. Embora não seja possível comparar diretamente as imagens, pois se tratam de amostras diferentes, a eficácia da ionização utilizando a membrana PTFE. Este aumento da sensibilidade está relacionado as características físicas da membrana, como a baixa transferência de carga dos analitos para a superfície da membrana e também a possibilidade do uso de ângulos (α) de contato mais elevados, dessorvendo melhor os analitos (MÜLLER et al., 2011; VOLNÝ et al., 2008).

As duas metodologias, DESI direta e DESI indireta, mostraram eficiência na determinação da localização dos alcaloides e acetogeninas, embora a DESI indireta tenha uma sensibilidade maior, é necessário um preparo de amostra maior que a DESI direta. A DESI indireta também pode ser utilizada em amostras frágeis que podem não aguentar o jato do spray diretamente em sua superfície, como por exemplo colônias de bactérias e fungos cultivadas em ágar. Já a DESI direta pode ser utilizada em amostras que possuam superfície mais regular e sejam mais resistentes (TATA et al., 2015).

Através da identificação dos alcaloides e a detecção das acetogeninas, é possível afirmar que a espectrometria de massas de alta resolução possui alta especificidade. A partir das imagens obtidas tanto por DESI direta como por DESI indireta foi possível detalhar a localização dos analitos em um nível molecular, a superfície da amostra. A partir disto, é possível monitorar alterações metabólicas e onde elas ocorrem na planta durante todo o ano, além de ser possível visualizar essas alterações em espécies de outras regiões. Além disso, esta técnica permite a

visualização do comportamento químico da planta na presença de patógenos como fungos e bactérias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises de infusão direta por ESI(+)-HRMS dos extratos das folhas foi possível verificar a presença de onze alcaloides, sendo sete aporfínicos: anonaina, nornantenina, *N*-nornuciferina, xilopina, litseferina, assimilobina e norisocoridina/isoboldina; dois oxoaporfínicos: lanuginosina e liriodenina; e dois benziltetrahidroisoquinolínicos: magnococlina/*N*-metilcoclaurina e reticulina. Entretanto, no extrato das sementes, somente foi possível a identificação de cinco alcaloides, sendo três aporfínicos: anonaina, assimilobina, norisocoridina/isoboldina e dois benziltetrahidroisoquinolínicos magnococlina/*N*-metilcoclaurina e reticulina, indicando que as folhas possuem uma diversidade maior de alcaloides do que as sementes. A fragmentação por HCD dos alcaloides está sendo relatado pela primeira vez na literatura. No extrato das folhas foi identificado seis acetogeninas, porém no extrato das sementes foi identificado oito acetogeninas, indicando que as sementes possuem uma diversidade maior de acetogeninas do que as folhas.

Na DESI direta foram realizadas as análises nos tecidos vegetais, sendo possível visualizar a distribuição espacial dos íons dos alcaloides e acetogeninas na superfície da folha, que foram previamente encontrados no extrato. Entretanto, o mapeamento das sementes, somente foi possível por DESI indireta através do *imprint* em membrana de PTFE, devido a superfície irregular da semente.

Entre as principais vantagens da DESI direta, está a possibilidade de uma análise rápida e *in natura* da amostra, com mínimo ou nenhum preparo de amostra sendo possível caracterizar rapidamente os analitos encontrados nas amostras. Já a DESI indireta mostrou uma capacidade maior com relação a análise semi-quantitativa e uma intensidade maior do sinal, embora seja necessário um tempo maior no preparo das amostras.

7 REFERÊNCIAS

AGRA, M. D. F. **Farmacopéia Popular da Paraíba**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba (MEC), 1977.

ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504–540, mar. 1999.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.

BARRECA, D. et al. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2302–2310, 2011.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 269, 2005.

BETTARINI, F. et al. Antiparasitic compounds from East African plants: Isolation and biological activity of anonaine, matricarianol, canthin-6-one and caryophyllene oxide. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 14, n. 01, p. 93–99, 19 fev. 1993.

BOSCOLO, O. H.; DE SENNA VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, BRASIL. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 63, n. 2, p. 263–272, 2008.

CABRAL, E. C. et al. Blotting assisted by heating and solvent extraction for DESI-MS imaging. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 6, p. 956–965, 2013.

CANNAS, S. et al. Chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial and antifungal activity of several essential oils. **Natural Product Research**, v. 30, n. 3, p. 332–339, 27 fev. 2016.

CARBALLO, A. I. et al. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 1, p. 6–12, 2010.

CHANG, F.-R. et al. New Adjacent Bis-Tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 241–246, mar. 2003.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, maio 2012.

CHEN, C.-Y. et al. Cheritamine, A New N -Fatty Acyl Tryptamine and Other Constituents from the Stems of *Annona cherimola*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 46, n. 1, p. 77–86, fev. 1999.

CHEN, J.-J. et al. Anti-Platelet Aggregation Alkaloids and Lignans from *Hernandia nymphaeifolia*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 251–256, abr. 2000.

CHEN, Y. et al. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 394–400, 2013.

COSTA, E. V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *annona foetida* mart. (annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714–9720, 2011.

COSTA, E. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 11, p. 1002–1006, jun. 2013.

COSTA, P. R. R. Natural products as starting point for the discovery of new bioactive compounds: Drug candidates with antiophidic, anticancer and antiparasitic properties. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009.

COY BARRERA, E. D.; CUCA SUÁREZ, L. E. In vitro inhibitory activities of Lauraceae aporphine alkaloids. **Natural product communications**, v. 5, n. 3, p. 383–6, mar. 2010.

DEWICK, P. M. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: **Medicinal Natural Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. p. 7–34.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 60–71, 2007.

DUTRA, L. M. et al. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 115–118, 2012.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, 2010. (Nota técnica).

GALLIMORE, A. R. The biosynthesis of polyketide-derived polycyclic ethers. **Nat. Prod. Rep.**, v. 26, n. 2, p. 266–280, 2009.

GAO, L. et al. Imaging of surface charge and the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 12, p. 5331–5337, 2010.

GARRETT, R. et al. Ambient mass spectrometry employed for direct analysis of intact Arabica coffee beans. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1172–1177, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GODE, D.; VOLMER, D. A. Lipid imaging by mass spectrometry - a review. **The Analyst**, v. 138, n. 5, p. 1289–315, 2013.

GRANADOS, H. et al. Actividad insecticida in vitro de las semillas de *Annona aff. spraguei* (Annonaceae) en dos modelos biológicos del énero de los dípteros : *Drosophila melanogaster* y *Aedes aegypti*. **Afinidad: Revista de química teórica y aplicada**, v. 58, n. 491, p. 44–48, 2001.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: A Textbook**. [s.l.] Springer, 2004.

GRZYBOWSKI, A. **FITOLARVICIDAS PARA O CONTROLE DO VETOR DA DENGUE E FEBRE AMARELA, *Aedes aegypti***. [s.l.] UFPR, 2011.

GU, Z. et al. Quantitative evaluation of Annonaceous acetogenins in monthly samples of paw paw (*Asimina triloba*) twigs by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 1, p. 32–38, jan. 1999.

GU, Z. M. et al. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 1911–1916, 1997.

HENNING, U. Book Review: The Biosynthesis of Steroids, Terpenes, and Acetogenins. By J. H. Richards and J. B. Hendrickson. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 5, n. 1, p. 148–149, jan. 1966.

HSU, C.-C.; DORRESTEIN, P. C. Visualizing life with ambient mass spectrometry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 31, n. Figure 1, p. 24–34, 2015.

HUANG, R. L. et al. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta medica**, v. 64, n. 3, p. 212–5, abr. 1998.

IFA, D. R. et al. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 259, n. 1-3, p. 8–15, jan. 2007.

JACKSON, A. U. et al. Targeted metabolomic analysis of *Escherichia coli* by desorption electrospray ionization and extractive electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 375, n. 2, p. 272–281, abr. 2008.

JEONG, E.-K. et al. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 26, n. 15, p. 1661–74, 15 ago. 2012.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de Anonáceas no Brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 55–64, 2014.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; HILLENKAMP, F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2935–2939, dez. 1985.

KIM, D. H. et al. Annomolin and annocherimolin, new cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 4, p. 502–506, 2001.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 225–242, 2014.

KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis: The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 7, n. 7, p. 1059–1070, 1 jul. 1995.

LE VEN, J. et al. Identification of the Environmental Neurotoxins Annonaceous Acetogenins in an *Annona cherimolia* Mill. Alcoholic Beverage Using HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 34, p. 8696–8704, 27 ago. 2014.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, jan. 1980.

LI, B. et al. Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 46, n. 12, p. 1241–6, 2011.

LI, B. et al. Visualizing metabolite distribution and enzymatic conversion in plant tissues by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. **The Plant Journal**, v. 74, n. 6, p. 1059–1071, jun. 2013.

LI, Y. et al. Pharmacokinetics and metabolism study of isoboldine, a major bioactive component from *Radix Linderae* in male rats by UPLC–MS/MS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 154–160, ago. 2015.

LIAW, C. C. et al. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. **Planta Medica**, v. 76, n. 13, p. 1390–1404, 2010.
LIAW, C.-C. et al. New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 470–475, abr. 2002.

LIKHITWITAYAWUID, K. et al. Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Tubers of *Stephania pierrei*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1468–1478, set. 1993.

LONDERSHAUSEN, M. et al. Molecular mode of action of annonins. **Pesticide Science**, v. 33, n. 4, p. 427–438, 1991.

LOPES, J. DE C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 125–131, 2014.

LUDWICZUK, A.; ASAKAWA, Y. Fingerprinting of Secondary Metabolites of Liverworts: Chemosystematic Approach. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 5, p. 1234–1243, 1 set. 2014.

LUDWICZUK, A.; ASAKAWA, Y. Chemotaxonomic value of essential oil components in liverwort species. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 30, n. 3, p. 189–196, maio 2015.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T. Rollinia. In: **Flora Neotropica Monograph**. 57. ed. New York: Organization for Flora Neotropica, 1992. p. 1–188.

MANN, J. **Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance**. Harlow: Longman Publishing Group, 1994.

MARSHALL, D. D. et al. Combining DI-ESI–MS and NMR datasets for metabolic profiling. **Metabolomics**, p. 391–402, 2014.

MATSUSHIGE, A. et al. Annonamine, a New Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Annona muricata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 257–259, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, 10 jul. 2015.

MORAIS, L. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 57–61, ago. 1998.

MÜLLER, T. et al. Direct plant tissue analysis and imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 14, p. 5754–5761, 2011.

MÜNZENBERG, G. Development of mass spectrometers from Thomson and Aston to present. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 349-350, n. 1, p. 9–18, 2013.

PAUL, J. et al. Anti Cancer Activity on Graviola, an Exciting Medicinal Plant Extract vs Various Cancer Cell Lines and a Detailed Computational Study on its Potent Anti-Cancerous Leads. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 14, p. 1666–1673, 2013.

PAULO, M. DE Q. et al. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 39–41, 1992.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**. 4. ed. Washington: Brooks Cole, 2009.

RABELO, D. DE M. et al. ISOQUINOLINE ALKALOIDS AND INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIPLASMODIAL ACTIVITIES OF *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453–1458, 2014.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. **Ann. Naturhist. Mus. Wien**, v. 108 B, n. Fries 1959, p. 191–206, 2007.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y.-H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237–278, mar. 1990.

SÃO JOSÉ, A. R. et al. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 86–93, 2014.

SCHMIDT, J. et al. Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 1, p. 325, 2005.

SCHRAMM, T. et al. ImzML - A common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 16, p. 5106–5110, 2012.

SEIDEL, V. **Natural Products Isolation**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 864
SENG, J. A. et al. Characterisation of sphingolipids in the human lens by thin layer chromatography-desorption electrospray ionisation mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 9, p. 1285–1291, 2014.

SICA, V. P. et al. Mass spectrometry imaging of secondary metabolites directly on fungal cultures. **RSC Adv.**, v. 4, n. 108, p. 63221–63227, 14 nov. 2014.

SILVA, F. M. A. DA et al. Desreplicação de alcaloides aporfinicos e oxoaporfinicos de *Unonopsis guatteroides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 944–947, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2001.

SIQUEIRA, C. A. T. **Aspectos químicos e atividade antiprotozoária in vitro de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae).** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

SLENO, L. The use of mass defect in modern mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 2, p. 226–236, fev. 2012.

STEVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 173–182, 1 mar. 2005.

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 237–256, jun. 2000.

SUN, S. et al. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2773–2776, 2014.

TAKÁTS, Z. et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5695, p. 471–473, 2004.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 10, p. 1261–1275, out. 2005.

TALATY, N.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. **The Analyst**, v. 130, n. 12, p. 1624–1633, 2005.

TATA, A. et al. Imprint Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging for Monitoring Secondary Metabolites Production during Antagonistic Interaction of Fungi. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 12298–12305, 15 dez. 2015.

TAVARES, L. et al. Elucidating Phytochemical Production in *Juniperus* sp.: Seasonality and Response to Stress Situations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4044–4052, maio 2013.

TEMPESTA, M. S.; KRIEK, G. R.; BATES, R. B. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3151–3153, jul. 1982.

TSABANG, N. et al. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 171–180, 2012.

VEGA, M. R. G. et al. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554–1559, 2007.

VENDRAMIN, M. E. et al. Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, n. September 2009, p. 152–155, 2013.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

VILAR, J.; FERRI, P.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 197–202, fev. 2011.

VOLNÝ, M. et al. Surface effects and electrochemical cell capacitance in desorption electrospray ionization. **The Analyst**, v. 133, n. 4, p. 525–531, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas**. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 1984.

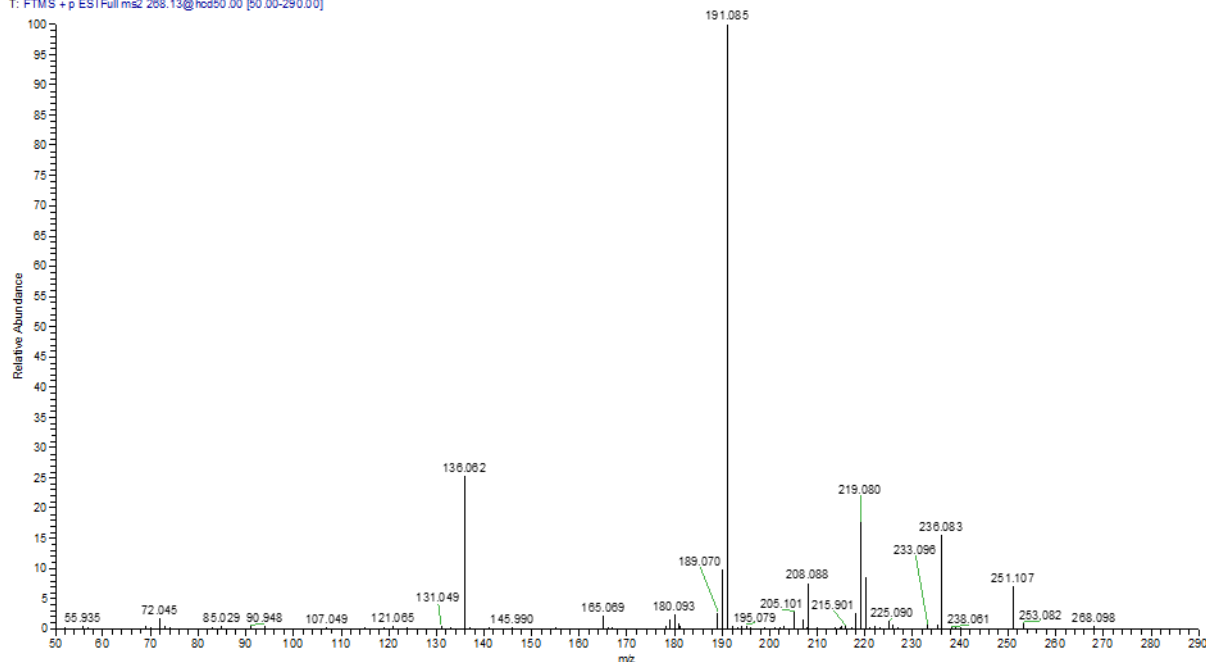
WISEMAN, J. M. et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18120–18125, 2008.

YU, S. M. et al. Dicentrine, a novel antiplatelet agent inhibiting thromboxane formation and increasing the cyclic AMP level of rabbit platelets. **Biochemical pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 323–9, 22 jan. 1992.

ANEXOS

ANEXO 1 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ANONAINA POR ESI(+)-MS.

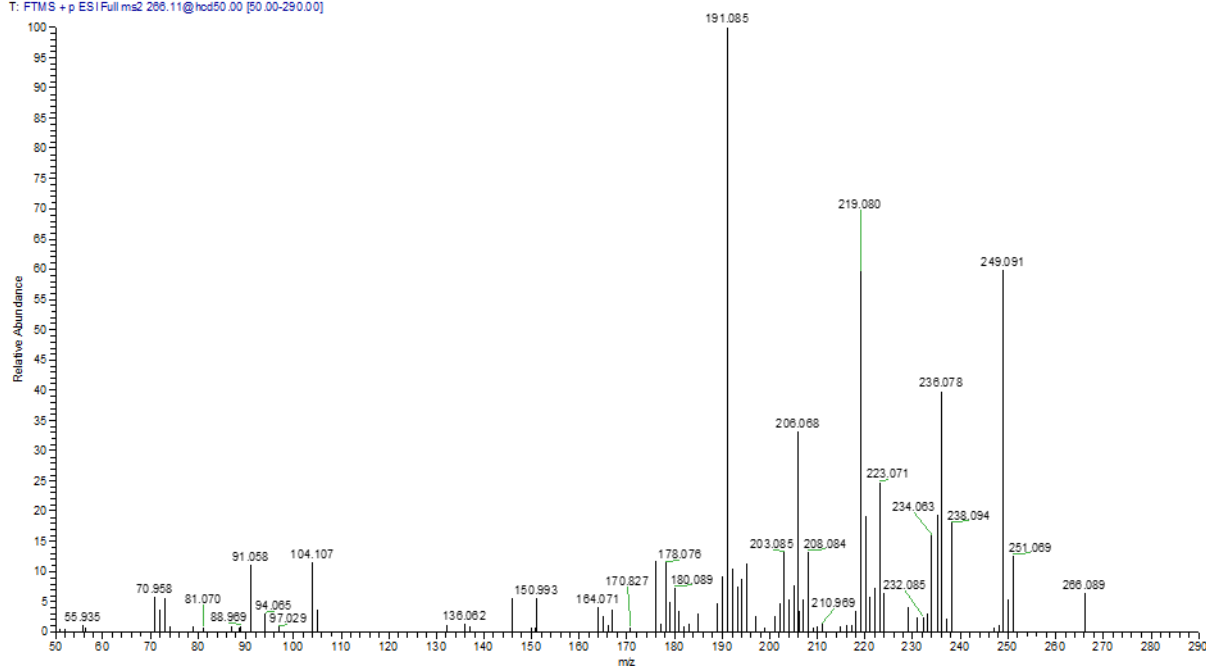
Rugulosa_MSMS_2 #354 RT: 0.88 AV: 1 NL: 5.31E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 288.13@hcd50.00 [50.00-290.00]



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 2 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ASIMIOLOBINA POR ESI(+)-MS

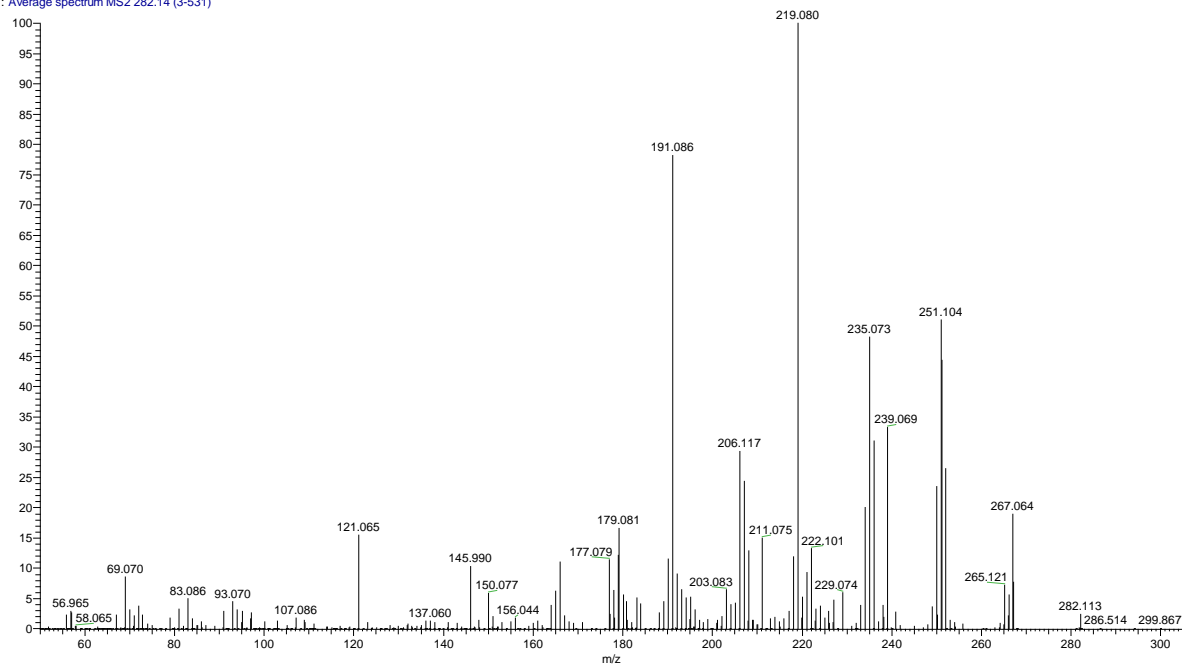
Rugulosa_MSMS_2 #23 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.31E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 288.11@hcd50.00 [50.00-290.00]



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 3 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA N-NORNUCIFERINA POR ESI(+)-MS

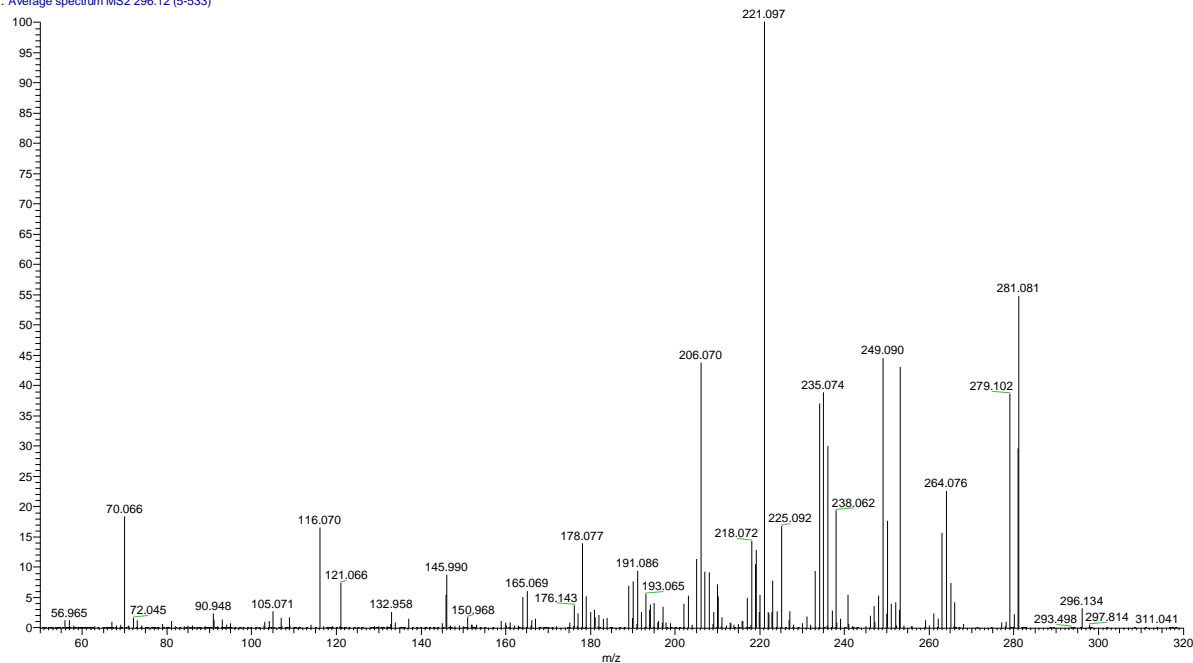
Rugulosa_MSMS_2_#3-531 RT: 0.01-0.99 AV: 25 NL: 8.20E5
T: Average spectrum MS2 282.14 (3-531)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 4 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA XILOPINA POR ESI(+)-MS

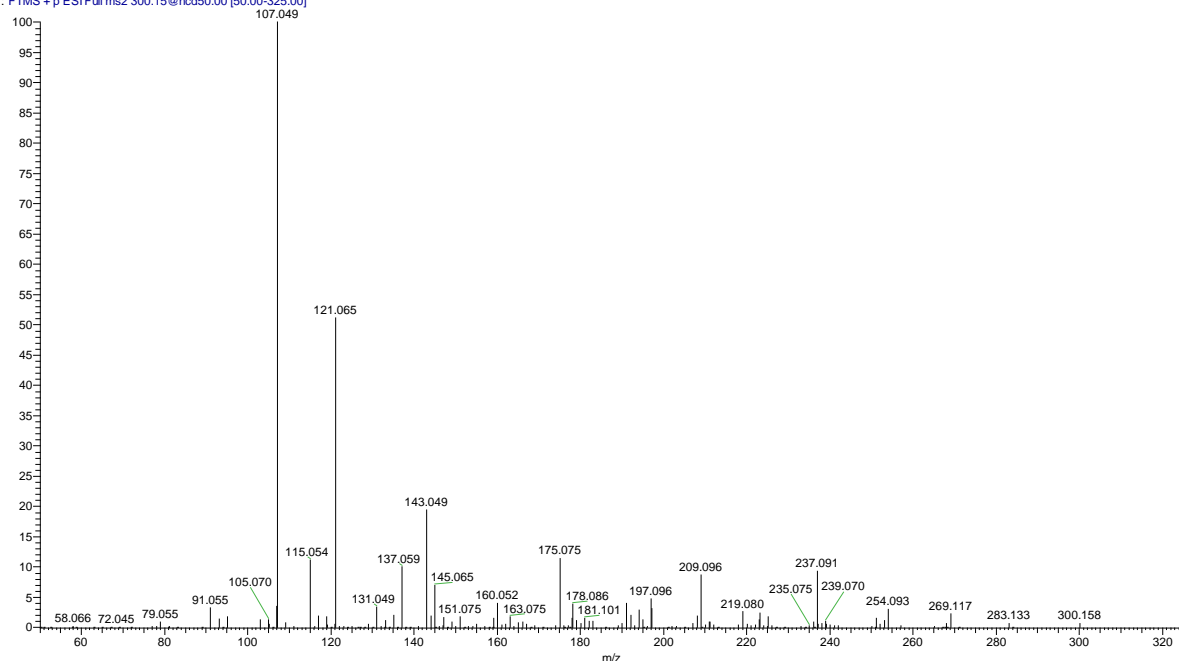
Rugulosa_MSMS_2_#5-533 RT: 0.01-0.99 AV: 25 NL: 1.09E6
T: Average spectrum MS2 296.12 (5-533)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 5 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA MAGNOCOCLINA/N-METILCOCLAURINA POR ESI(+)-MS

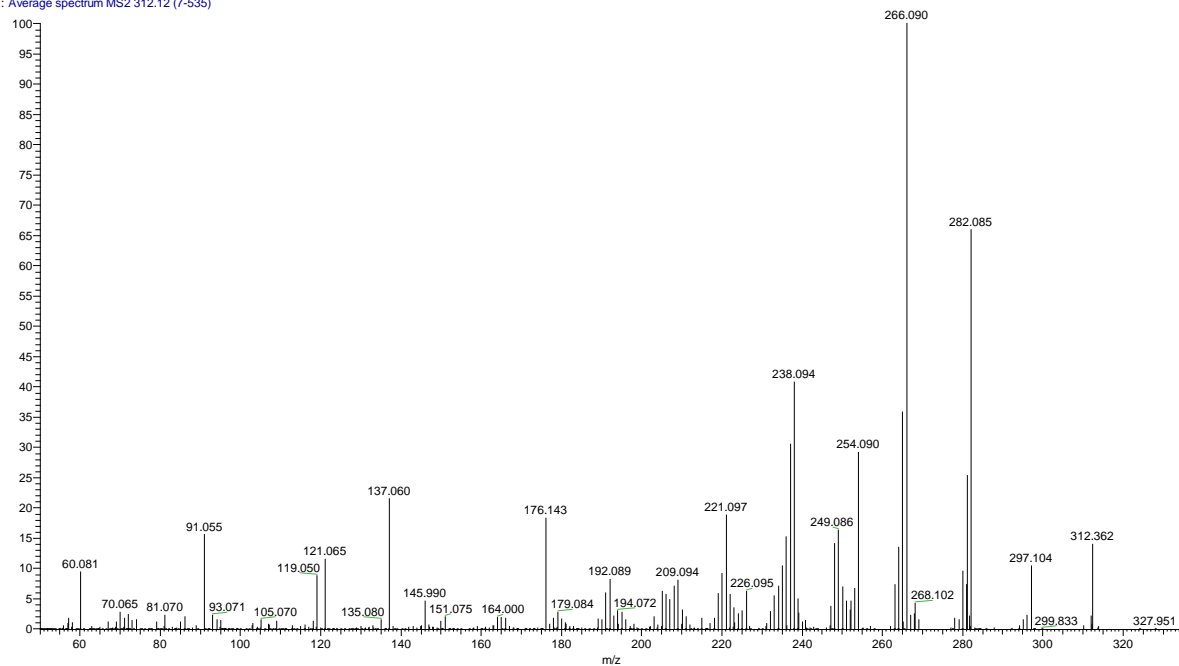
Rugulosa_MSMS_2 #270 RT: 0.51 AV: 1 NL: 4.43E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 300.15@hcd50.00 [50.00-325.00]



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 6 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO LITSEFERINA POR ESI(+)-MS.

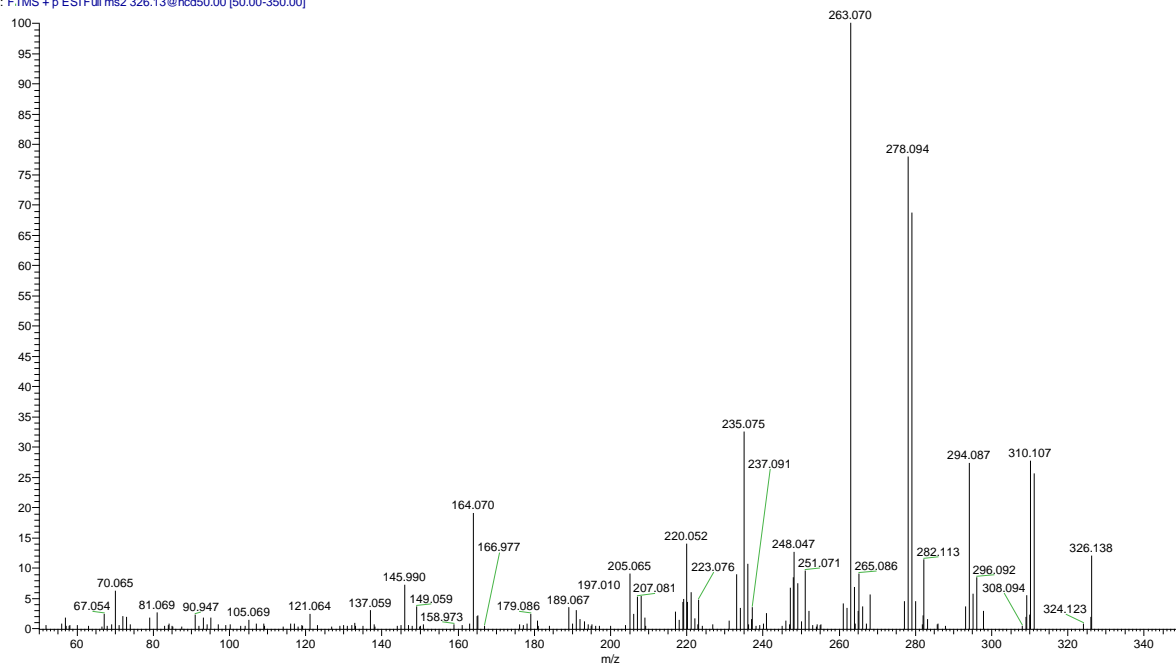
Rugulosa_MSMS_2 #7-535 RT: 0.01-1.00 AV: 25 NL: 8.73E5
T: Average spectrum MS2 312.12 (7-535)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 7 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA NORNANTENINA POR ESI(+)-MS.

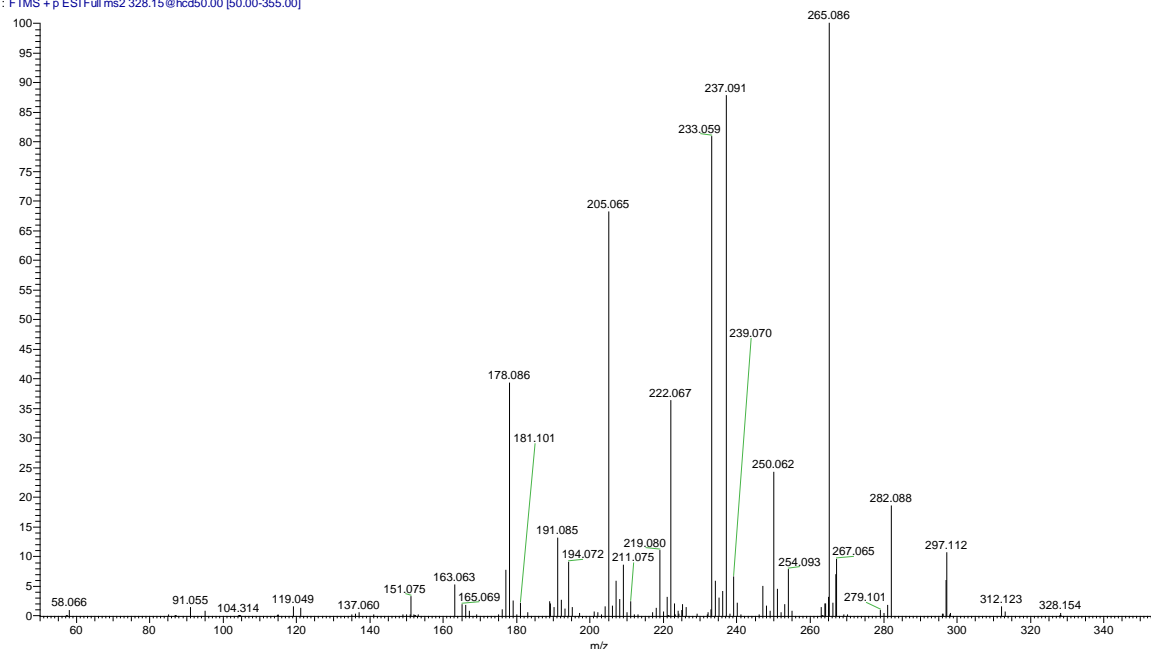
Rugulosa_MSMS_2 #472 RT: 0.88 AV: 1 NL: 7.25E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 326.13@hcd50.00 [50.00-350.00]



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 8 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA NORISOCORIDINA POR ESI(+)-MS.

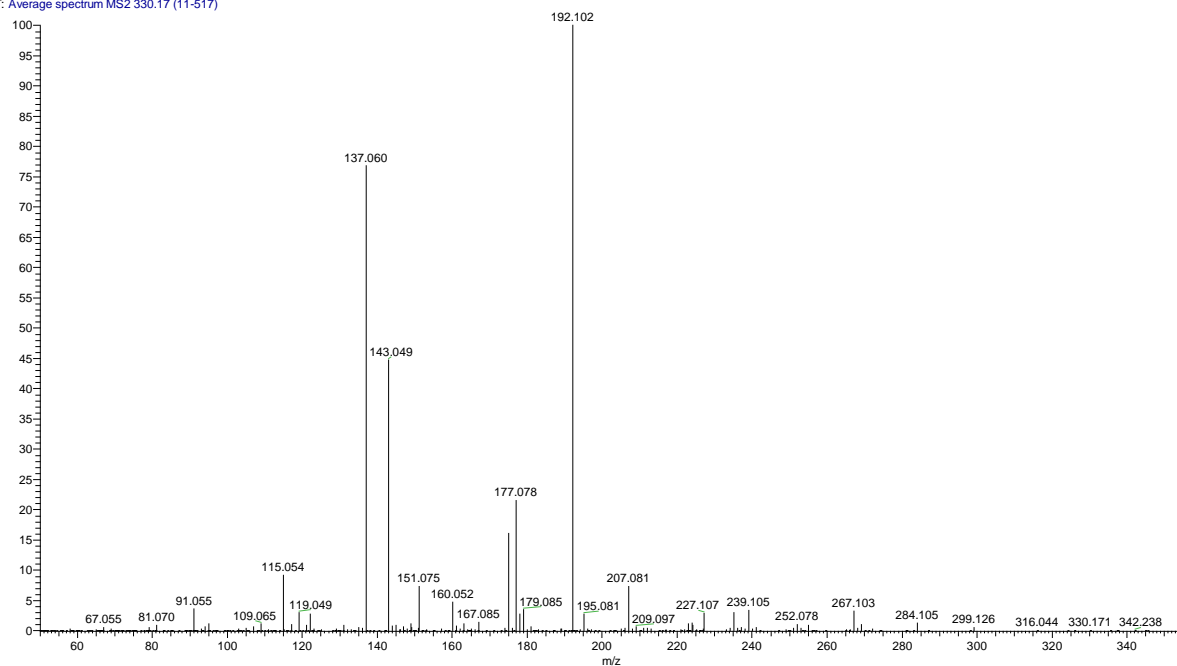
Rugulosa_MSMS_2 #361 RT: 0.68 AV: 1 NL: 2.98E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 328.15@hcd50.00 [50.00-355.00]



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 9 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA RETICULINA POR ESI(+)-MS.

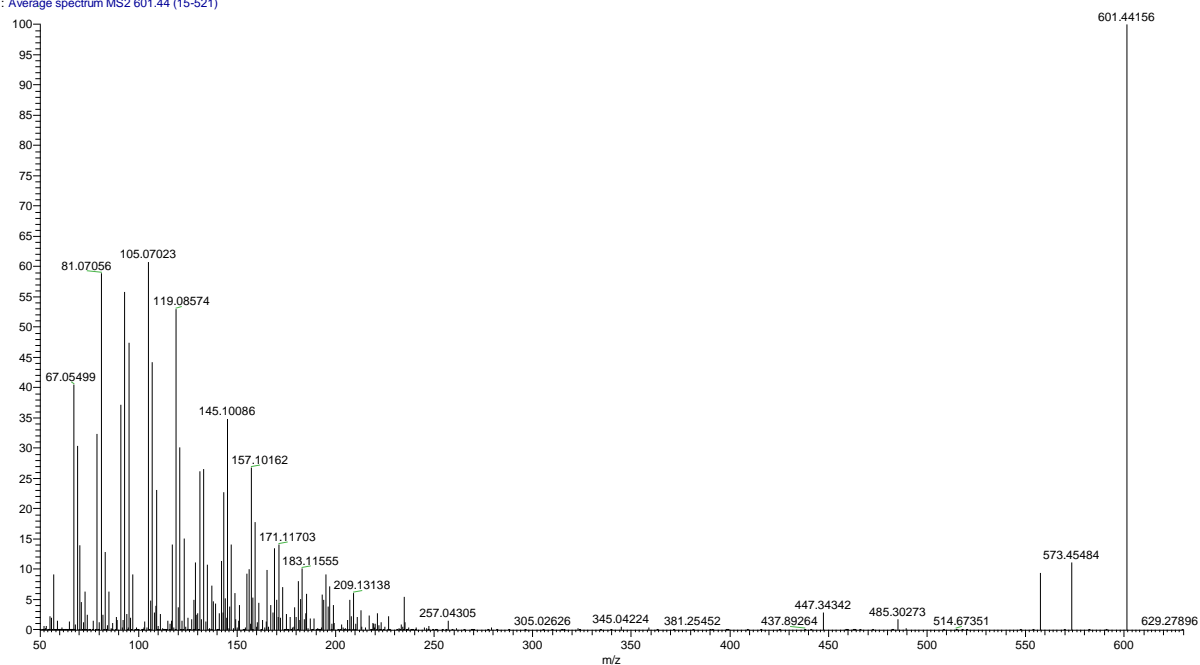
Rugulosa_MSMS_2 #11-517 RT: 0.02-0.96 AV: 24 NL: 6.64E7
T: Average spectrum MS2 330.17 (11-517)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 10 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG1 POR ESI(+)-MS.

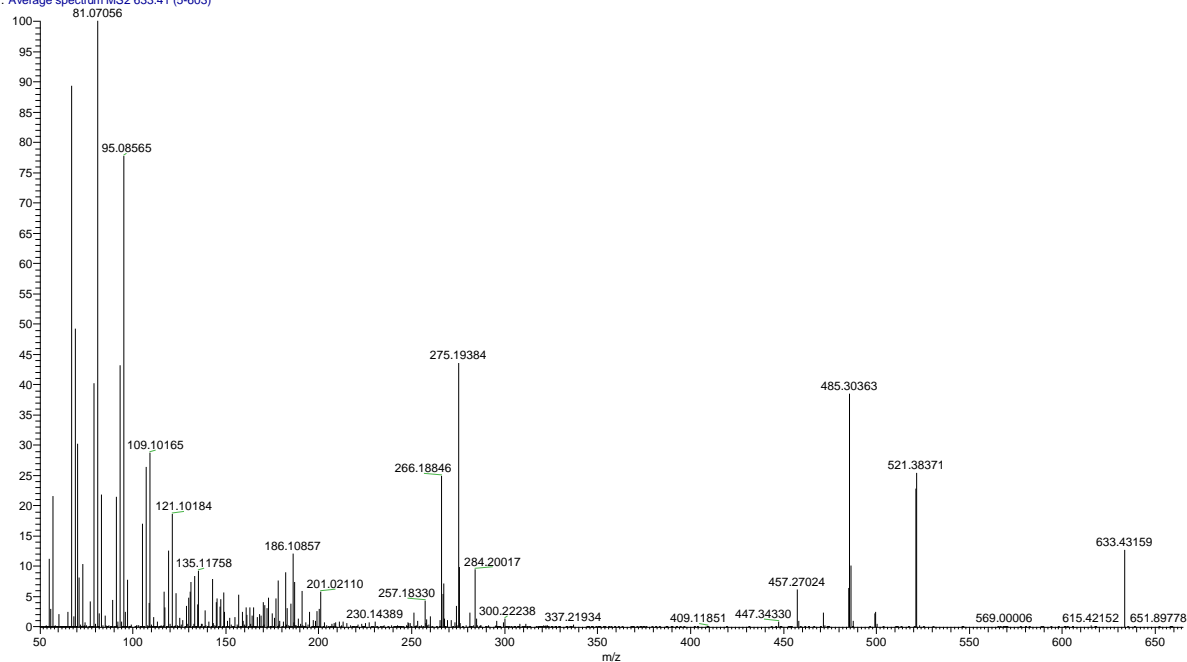
Rugulosa_MSMS_2 #15-521 RT: 0.03-0.97 AV: 24 NL: 1.63E5
T: Average spectrum MS2 601.44 (15-521)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 11 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG2 POR ESI(+)-MS.

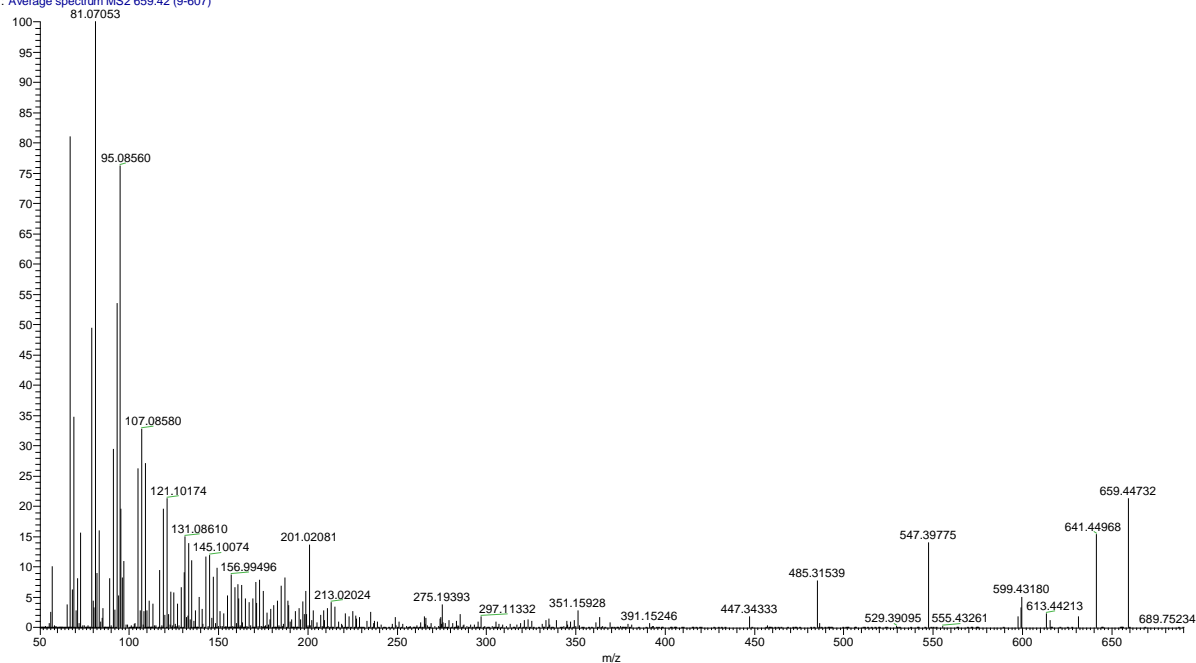
MSMS_Rugulosa #5-603 RT: 0.01-0.99 AV: 47 NL: 2.87E5
T: Average spectrum MS2 633.41 (5-603)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 12 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG3 POR ESI(+)-MS.

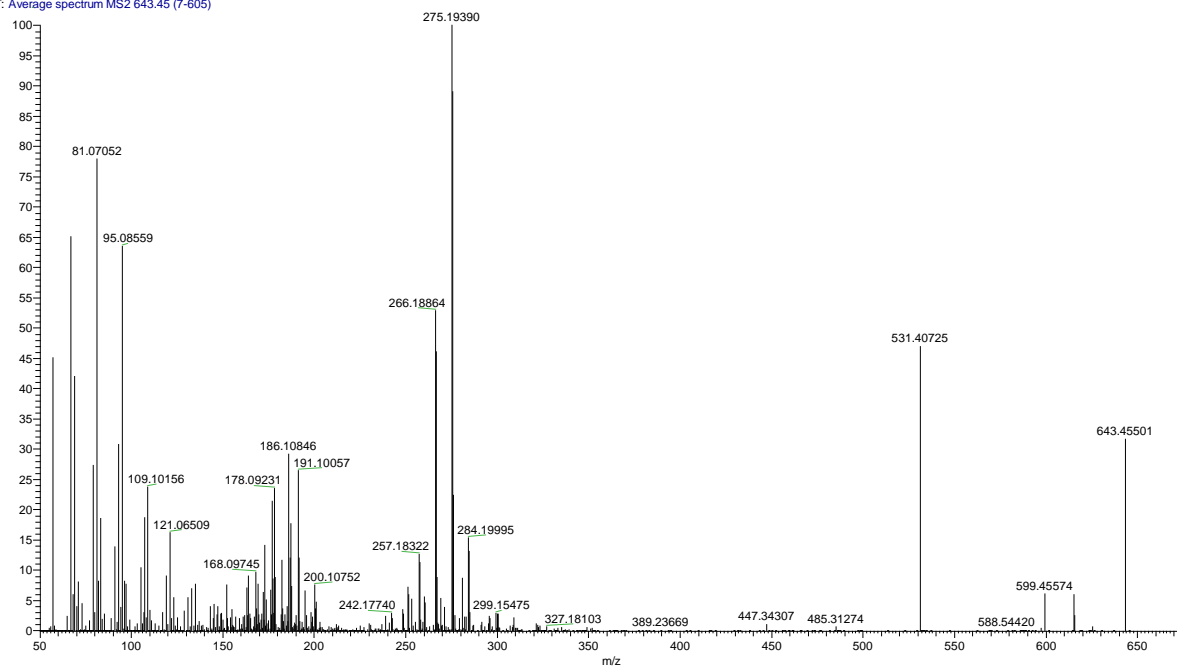
MSMS_Rugulosa #9-607 RT: 0.02-1.00 AV: 47 NL: 1.01E6
T: Average spectrum MS2 659.42 (9-607)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 13 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG4 POR ESI(+)-MS.

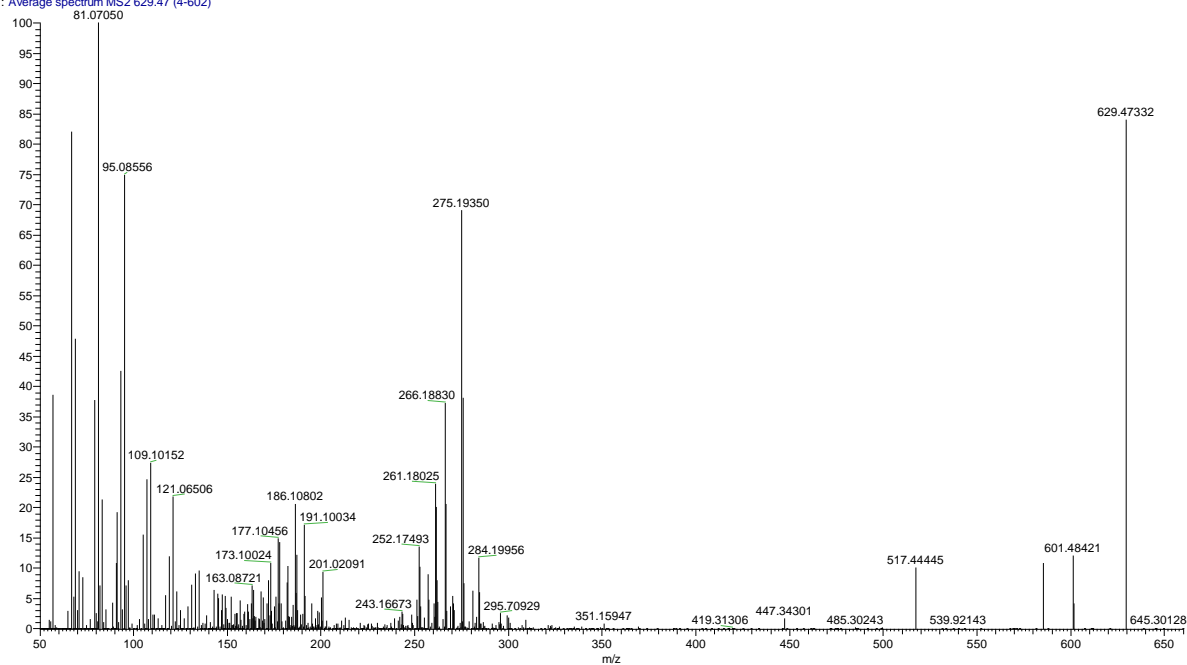
MSMS_Rugulosa #7-605 RT: 0.01-1.00 AV: 47 NL: 1.81E6
T: Average spectrum MS2 643.45 (7-605)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 14 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG5 POR ESI(+)-MS.

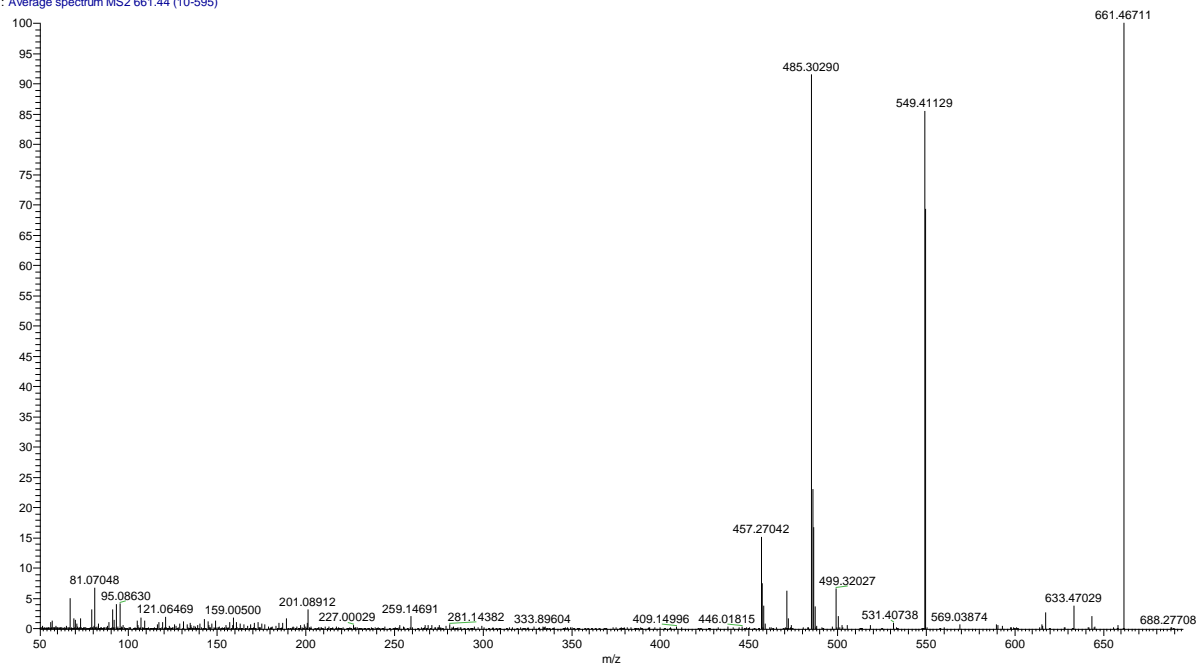
MSMS_Rugulosa #4-602 RT: 0.01-0.99 AV: 47 NL: 7.51E5
T: Average spectrum MS2 629.47 (4-602)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 15 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG6 POR ESI(+)-MS.

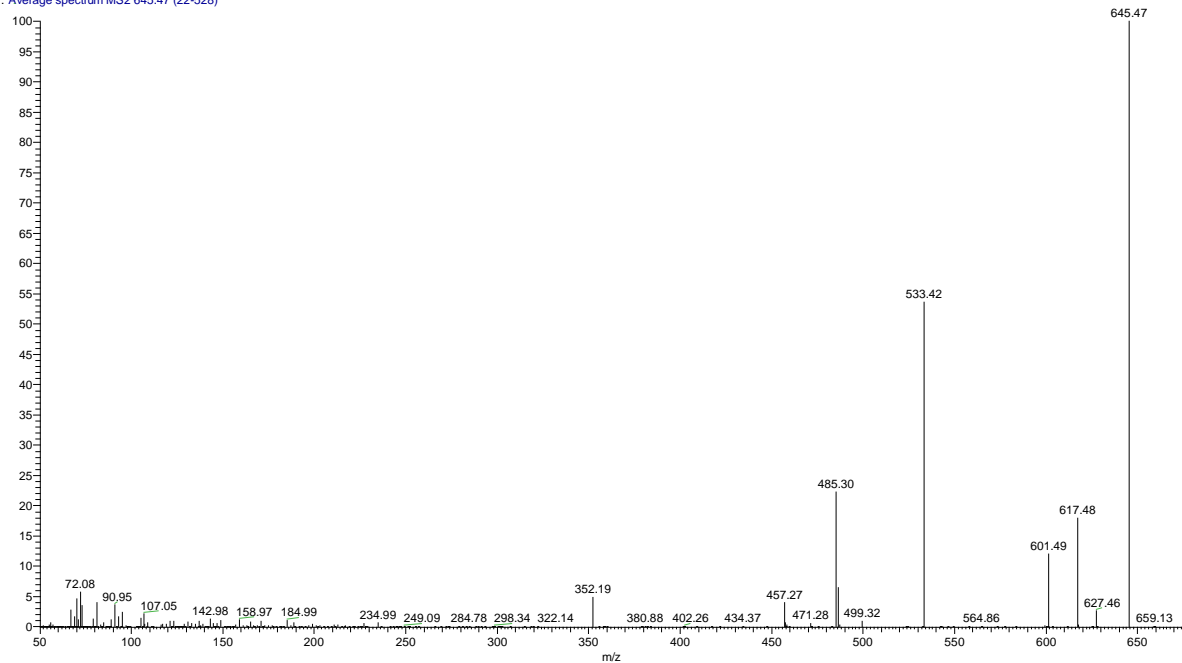
MSMS_Rugulosa #10-595 RT: 0.02-0.98 AV: 46 NL: 9.18E5
T: Average spectrum MS2 661.44 (10-595)



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 16 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG7 POR ESI(+)-MS.

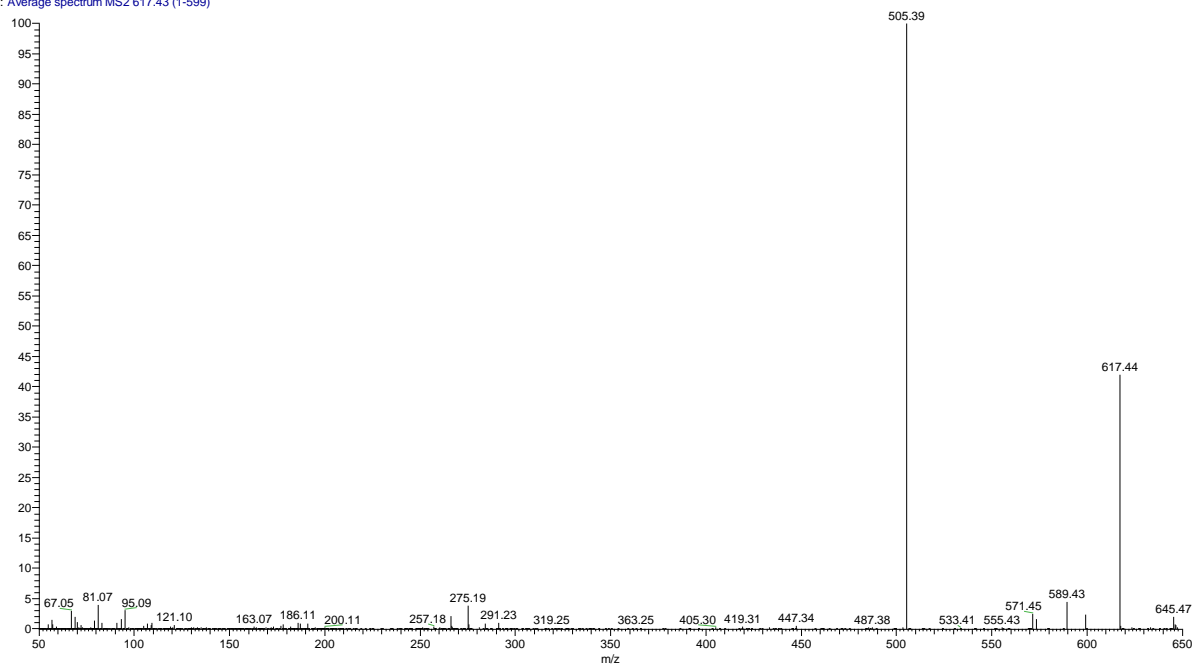
Rugulosa_MSMS_2 #22-528 RT: 0.04-0.98 AV: 24 NL: 4.90E5
T: Average spectrum MS2 645.47 (22-528)



FONTE: O autor (2016)

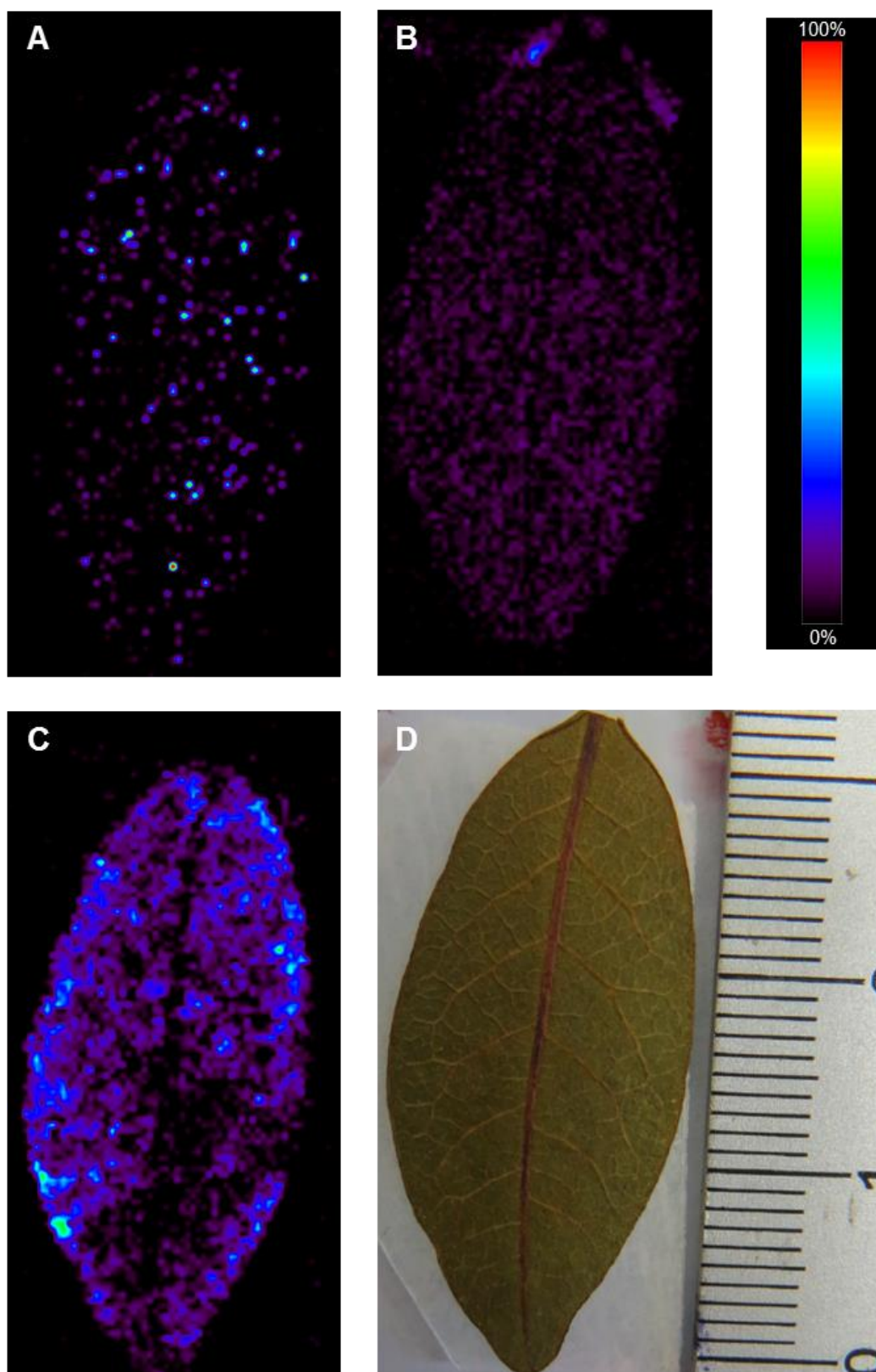
ANEXO 17 - ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA ACG8 POR ESI(+)-MS.

MSMS_Rugulosa #1-599 RT: 0.01-0.99 AV: 47 NL: 3.27E6
T: Average spectrum MS2 617.43 (1-599)



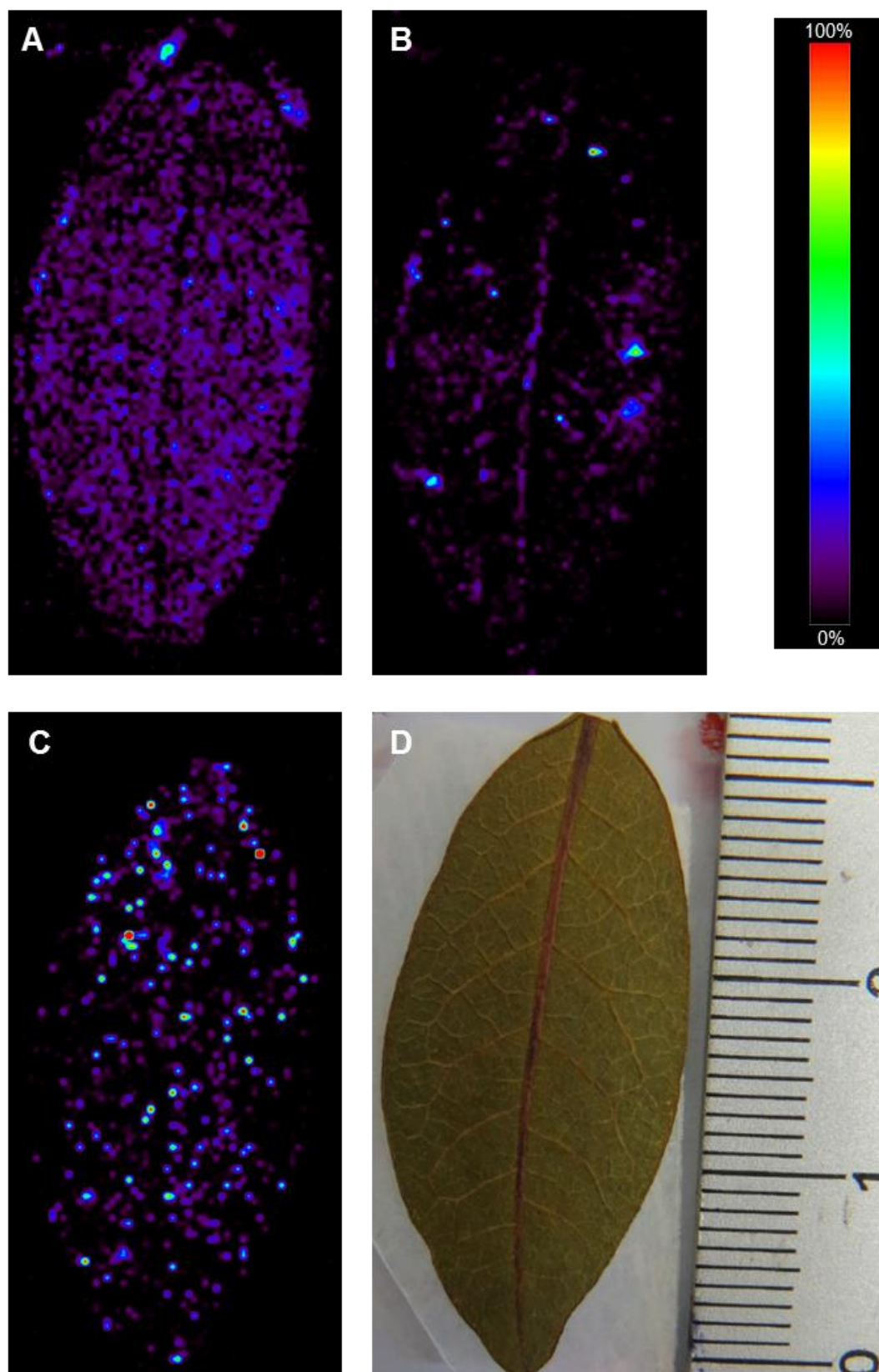
FONTE: O autor (2016)

ANEXO 18 - IMAGENS DOS ALCALOIDES LANUGINOSINA (A), LITSEFERINA (B) E MAGNOCOCLINA (C) DIRETAMENTE NA FOLHA DE *A. rugulosa* (D) POR DESI(+)-MSI.



FONTE: O autor (2016)

ANEXO 19 - IMAGENS DOS ALCALOIDES N-NORCIFERINA (A), NORNANTENINA (B) E XILOPINA (C) DIRETAMENTE NA FOLHA DE *A. rugulosa* (D) POR DESI(+)-MSI.



FONTE: O autor (2016)